



La coévolution antagoniste bactérie - bactériophage : contraintes génétiques appliquées au modèle expérimental *Escherichia coli* - PhiX174

Alix Cavalié Michel

► To cite this version:

Alix Cavalié Michel. La coévolution antagoniste bactérie - bactériophage : contraintes génétiques appliquées au modèle expérimental *Escherichia coli* - PhiX174. Microbiologie et Parasitologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : 2010PA066018 . tel-00814845

HAL Id: tel-00814845

<https://theses.hal.science/tel-00814845>

Submitted on 17 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
en Sciences de la vie**

Ecole doctorale : Diversité du Vivant

Discipline : Microbiologie

Présentée par **Mme Alix CAVALIE MICHEL**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

La coévolution antagoniste bactérie – bactériophage

Contraintes génétiques appliquées au modèle expérimental
Escherichia coli - PhiX174

Soutenue le 2 Février 2010

devant le jury composé de :

Dr Pascale BOULANGER-BIARD	Rapporteur
Dr Sylvain GANDON	Rapporteur
Pr Michael DUBOW	Examineur
Pr Dominique HIGUET	Examineur
Dr Olivier TENAILLON	Directeur de thèse

A Pierre-Emmanuel

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'équipe mixte INSERM U722 - Paris Diderot, d' « Ecologie et Evolution des Microorganismes » dirigée par Erick Denamur.

Je tiens à remercier Olivier Tenaillon, mon directeur de thèse, pour son enthousiasme scientifique et son intarissable flot d'idées. Pour toutes les fois où il m'a expliqué avec patience et bienveillance concepts et idées.

Je remercie Pascale Boulanger-Biard et Sylvain Gandon, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Michael Dubow et Dominique Higuët d'avoir accepté d'être membres de mon jury.

Je remercie Erick Denamur de m'avoir accueillie dans son laboratoire ; pour les nombreux séminaires de microbiologie médicale, expérimentale et théorique qui ont été autant d'occasions de découvrir la recherche.

Je remercie chaleureusement Bertrand Picard, pour le temps qu'il a consacré à la relecture de mon manuscrit, pour sa gentillesse et ses remarques constructives.

Je tiens à remercier l'Institut de Formation Doctorale de l'Université Pierre et Marie Curie, pour la qualité des multiples formations proposées.

Je remercie Olivier Clermont, pour ses précieux conseils de biologie moléculaire et pour les discussions que nous avons eues ensemble.

Mes remerciements vont aussi à Emmanuelle Salgado et Cécile Gateau pour leur aide précieuse dans les manipulations.

Je remercie bien sûr l'ensemble de l'unité U722 : Houda, Cécile, Maxime, Mathilde et tous les autres, mais aussi Ariane Bize d'Avezac et Thomas Berngruber pour toutes les conversations scientifiques ou non, leurs encouragements et les pauses café...

Merci à mes parents, beaux-parents, ma famille et mes amis, qui m'ont encouragée, se sont intéressés à mon travail, et surtout grâce à qui j'ai pu me changer les idées !

Enfin, je remercie mon p'tit mari, Pierre-Emmanuel, pour son soutien quotidien, sa curiosité, et sa relecture attentive.

RESUME

Les bactéries et les bactériophages sont ubiquitaires. Parasites obligatoires des bactéries, les bactériophages modifient fortement la diversité et la dynamique des populations bactériennes. Comprendre l'interaction bactérie-bactériophage, pour prévoir et contrôler leur évolution a de nombreux intérêts en écologie, industrie, et en santé publique. La coexistence des bactéries et des bactériophages repose en partie sur la coévolution antagoniste qui s'établit entre eux. Nous avons choisi d'étudier les contraintes génétiques limitant la coévolution entre *Escherichia coli* et PhiX174.

En étudiant la niche écologique de PhiX174, nous avons établi que les souches sensibles à ce bactériophage étaient à la fois rares et remarquables par leur diversité phylogénétique. De plus, alors que le lipopolysaccharide (LPS) est le récepteur reconnu par PhiX174, nous avons démontré que PhiX174 peut lyser des bactéries arborant des LPSs très variés, ce qui contraint la population bactérienne à résister autrement qu'en modifiant son récepteur. Puis, en modifiant le génotype de l'hôte bactérienensemencé avec PhiX174, nous avons profondément altéré la pérennité de la coexistence bactérie-bactériophage. Enfin, nous avons mis en place un protocole de coévolution entre *E. coli* C et PhiX174 qui nous a permis de discuter de l'évolution de la pression de sélection induite par les bactériophages sur la population bactérienne et de l'existence d'un compromis entre virulence et infectivité.

Il semblerait, en définitive, que les fortes relations épistatiques entre les gènes participant à l'interaction bactérie-bactériophage, sont autant de contraintes génétiques qui s'ajoutent aux contraintes écologiques déjà décrites et limitent la coévolution antagoniste qui s'établit entre *E. coli* et PhiX174.

MOTS CLES

Coévolution antagoniste, *Escherichia coli*, PhiX174, contraintes génétiques.

TITRE ET RESUME EN ANGLAIS

TITLE

**Antagonistic coevolution between bacteria and bacteriophages
Genetic constraints applied on the experimental model *Escherichia coli* C – PhiX174.**

ABSTRACT

Bacteria and bacteriophages are ubiquitous. Obligate parasites of bacteria, bacteriophages significantly alter the diversity and the dynamics of bacterial populations. Understanding the interactions between bacteria and bacteriophages in order to predict and control their evolution, has many interests in ecology, industry, and public health. The coexistence of bacteria and bacteriophages is partly due to antagonistic coevolution dynamics that established between them. Here, we chose to study the genetic constraints limiting the coevolution between *Escherichia coli* and PhiX174.

Studying the ecological niche of PhiX174, we found that the sensitive strains to this bacteriophage, were both rare and remarkable for their phylogenetic diversity. Moreover, while the lipopolysaccharide (LPS) is recognized as the receptor of PhiX174, we demonstrated that PhiX174 can lyse bacteria displaying a variety of LPS, compelling the bacterial population to resist except by amending its receptor. Then, modifying the genotype of the bacterial host inoculated with PhiX174, we have profoundly altered the duration of the bacteria-phage coexistence. Finally, we established a protocol of coevolution between *E. coli* and PhiX174 which allowed us to discuss the evolution of the selection pressure induced by bacteriophages on bacterial population and the existence of a compromise between virulence and infectivity.

It seems, ultimately, that epistatic relationships between genes involved in bacteria-bacteriophage interactions are strong genetic constraints limiting the antagonistic coevolution between *E. coli* and PhiX174, in addition to ecological constraints already described.

Key words : Antagonistic coevolution, genetic constraints, *Escherichia coli*, PhiX174.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
RESUME	4
TITRE ET RESUME EN ANGLAIS	5
SOMMAIRE	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	10
ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	12

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
-----------------------	----

I. DECOUVERTE DES BACTERIES ET DES BACTERIOPHAGES

1. DECOUVERTE DES BACTERIES	13
2. DECOUVERTE DES VIRUS ET DES BACTERIOPHAGES	13

II. IMPORTANCE ECOLOGIQUE DE L'INTERACTION BACTERIE - BACTERIOPHAGE

1. IMPORTANCE NUMERIQUE DES POPULATIONS BACTERIENNES ET PHAGIQUES	16
2. ECOLOGIE BACTERIENNE	16
a. Détection et diversité des bactéries de l'environnement	16
b. Un maillon essentiel des réseaux trophiques	17
3. ECOLOGIE VIRALE	18
a. Détection des virus et diversité des bactériophages	18
b. Taxonomie des virus	19
c. Cycle de vie des bactériophages : bactériophages virulents et bactériophages tempérés	22
d. Spécificité d'hôte des virus	24
e. Transferts génétiques	25
4. IMPACT DE LA LYSE PAR LES BACTERIOPHAGES SUR L'ECOLOGIE BACTERIENNE	26
a. Recyclage des nutriments et influence sur le climat	26
b. Dynamique des populations phagiques et bactériennes	26
5. EVOLUTION DE L'INTERACTION BACTERIE - PHAGE	28

III. LA COEVOLUTION ANTAGONISTE BACTERIE – VIRUS

1. INFECTIVITE, PRODUCTIVITE, VIRULENCE ET RESISTANCE	29
2. THEORIE DE « LA REINE ROUGE »	30
3. DES MODELES THEORIQUES POUR ILLUSTRER LA COEVOLUTION ANTAGONISTE	30

a. <i>Modèle « gène pour gène »</i>	30
b. <i>Modèle « aux allèles correspondants »</i>	32
c. <i>Un continuum de possibilités d'évolution, du modèle « gène pour gène » au modèle aux « allèles correspondants »</i>	33
4. LES SYSTEMES BACTERIE – BACTERIOPHAGE EXPERIMENTAUX « CLASSIQUES »	34
a. <i>E. coli B et les bactériophages T</i>	34
b. <i>E. coli O157:H7 et son phage</i>	36
c. <i>E. coli et un mutant lytique du phage Lambda</i>	36
d. <i>Pseudomonas fluorescens et son phage Phi2</i>	37
e. <i>P. syringae et Phi6</i>	37
5. LIMITATIONS DE LA COEVOLUTION ANTAGONISTE	37
6. SITUATION D'EQUILIBRE	39
7. PARAMETRES DETERMINANTS POUR LA DYNAMIQUE DE COEVOLUTION	39
a. <i>La valeur des coûts de résistance/virulence</i>	40
b. <i>Taille et densité de la population hôte</i>	40
c. <i>La compétition entre parasites pour un même hôte</i>	40
d. <i>La structuration de l'espace</i>	41
e. <i>Agitation et perturbations physiques</i>	42
f. <i>La migration</i>	42
 <u>IV. LE SYSTEME EXPERIMENTAL E. COLI – PHIX174</u>	 44
1. E. COLI	44
a. <i>Microorganisme modèle au laboratoire et outil en biotechnologie</i>	45
b. <i>Le lipopolysaccharide LPS d'E. coli, récepteur de PhiX174</i>	45
c. <i>Biosynthèse du noyau interne du LPS</i>	46
d. <i>Le LPS d'E. coli C et sa sensibilité à PhiX174</i>	48
2. PHIX174	48
a. <i>PhiX174, un petit Microviridae lytique</i>	48
b. <i>Occurrence et niche des Microvirus</i>	49
c. <i>Caractérisation physique de PhiX174</i>	50
d. <i>Génome de PhiX174</i>	50
e. <i>Reconnaissance du LPS des bactéries sensibles</i>	51
f. <i>Son cycle de vie</i>	52
g. <i>Expression des gènes de PhiX174</i>	54
h. <i>Mutations de résistance à PhiX174 chez E. coli</i>	54
3. EXPERIMENTATIONS AVEC LE SYSTEME E. COLI – PHIX174	55
 <u>V. CONCLUSION</u>	 56

<u>I. ECOLOGIE DE LA SENSIBILITE A PHIX174</u>	58
1. INTRODUCTION	58
2. ARTICLE « BACTERIOPHAGE PHIX174'S ECOLOGICAL NICHE AND THE FLEXIBILITY OF ITS ESCHERICHIA COLI LIPOPOLYSACCHARIDE RECEPTOR »	58
3. COMMENTAIRES DE L'ARTICLE : RESULTATS ET DISCUSSION	64
a. Sensibilité à PhiX174 des isolats naturels d'E. coli	64
b. Sensibilité à PhiX174 des mutants d'E. coli K-12, modifiés au niveau du noyau du LPS	65
c. Niche écologique de PhiX174	67
4. EXPERIMENTATIONS COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE	67
5. CRITIQUE DU PROTOCOLE DE SCREENING DES SOUCHES SENSIBLES A PHIX174	68
6. CONCLUSIONS	69
<u>II. GENOTYPE BACTERIEN ET PERENNITE DE LA COEVOLUTION</u>	71
1. INTRODUCTION	71
2. MATERIEL ET METHODES	72
a. Construction des mutants bactériens	72
b. Conditions de l'expérimentation	74
c. Suivi de la coexistence bactérie - bactériophage	75
3. RESULTATS ET DISCUSSION	75
a. Durée de coexistence et génotype de l'hôte	75
b. Densité bactérienne et coexistence bactérie – bactériophage	78
c. Valeur sélective des génotypes et potentiel coévolutif	79
4. CONCLUSIONS	81
5. PERSPECTIVES	81
<u>III. TAUX D'EVOLUTION DU BACTERIOPHAGE PHIX174 EN COEVOLUTION CONTINUE AVEC E. COLI C</u>	82
1. CONTEXTE	82
2. ARTICLE « VIRAL EVOLUTION RATE IN A COEVOLVING ESCHERICHIA COLI C - PHIX174 SYSTEM »	83
3. COMMENTAIRES DE L'ARTICLE : RESULTATS ET DISCUSSION	99
a. Coévolution dynamique entre E. coli et PhiX174	100
b. Séquençage des virus du jour 20	100
c. Taille de la population virale et productivité	101
d. Un compromis entre infectivité et productivité	101

<i>e. Stabilité du système biologique en coévolution</i>	102
<i>f. Analyse critique du protocole</i>	102
4. DISCUSSION ET OBSERVATIONS COMPLEMENTAIRES	103
<i>a. Les virus de la population E4</i>	103
<i>b. Extinction des virus dans les populations C2 et C3</i>	103
<i>c. Critique du protocole de mesure de titration sur l'hôte ancestral.</i>	104
5. CONCLUSION	104
 DISCUSSION	 105
 <u>I. CONTRAINTES GENETIQUES LIMITANT LA COEVOLUTION ANTAGONISTE ENTRE <i>E. COLI</i> ET PHIX174</u>	 <u>105</u>
1. EPISTASIE ET STRUCTURE DES « RESEAUX DES MUTATIONS POSSIBLES »	106
2. MODELES EVOLUTIFS ET STRUCTURE DU « RESEAU DES MUTATIONS POSSIBLES »	111
3. PROPAGATION DES GENOTYPES MUTES DANS LES POPULATIONS	113
4. CONFRONTATION DES « RESEAUX DES MUTATIONS POSSIBLES »	113
5. RESEAUX DES MUTATIONS POSSIBLES D'E. COLI B ET COEVOLUTION AVEC LES PHAGES T	114
6. PARAMETRES DE DYNAMIQUE DES POPULATIONS	115
 <u>II. PERTINENCE DU CHOIX DU SYSTEME EXPERIMENTAL E. COLI – PHIX174 ET PERSPECTIVES MULTIPLES</u>	 <u>118</u>
1. APPLICATIONS INDUSTRIELLES	119
<i>a. Utiliser l'infectivité des phages pour identifier/détruire des bactéries</i>	119
<i>b. Maîtriser la résistance des bactéries aux phages</i>	120
2. APPLICATIONS ECOLOGIQUES	121
3. APPLICATIONS EN SANTE PUBLIQUE	121
<i>a. La phagothérapie</i>	121
<i>b. Autres solutions thérapeutiques dérivées de l'étude des phages</i>	123
 CONCLUSION	 125
ANNEXE	126
BIBLIOGRAPHIE	129

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 – p17	Arbre phylogénétique du monde vivant.
Figure 2 – p20	Diversité des bactériophages.
Figure 3 – p21	Arbre protéomique reliant les bactériophages.
Figure 4 – p22	Cycles de vie des bactériophages.
Figure 5 – p31	Modèle théorique d'évolution « gène pour gène ».
Figure 6 – p32	Modèle théorique d'évolution « aux allèles correspondants ».
Figure 7 – p47	Biosynthèse du noyau du LPS d' <i>E. coli</i> C.
Figure 8 – p50	Capside et génome de PhiX174.
Figure 9 – p52	Cycle de vie de PhiX174.
Figure 10 – p66	Noyaux des LPS d' <i>E. coli</i> reconnus par PhiX174.
Figure 11 – p71	Etapes de l'infection d' <i>E. coli</i> C par le phage PhiX174 perturbées par la délétion des gènes <i>rfaC</i> , <i>recC</i> et <i>slyD</i> .
Figure 12 – p76	Pérennité de la coexistence bactérie – bactériophage.
Figure 13 – p79	Evolution des concentrations bactériennes et coexistence bactérie - bactériophage.
Figure 14 – p80	Courbes de croissance en milieu liquide des génotypes <i>E. coli</i> C, <i>E. coli</i> C Δ - <i>rfaC</i> , <i>E. coli</i> C Δ - <i>rfaC</i> , <i>E. coli</i> C Δ - <i>rfaC</i> .
Figure 15 – p106	Le « réseau des mutations possibles ».
Figure 16 – p107	Valeurs sélectives associées aux génotypes.
Figure 17 – p109	Mutations létales et structure du « réseau des mutations possibles ».
Figure 18 – p112	Modèle évolutif et structure du « réseau des mutations possibles ».
Figure 19 – p115	« Réseau des mutations possibles » pour la coévolution entre <i>E. coli</i> B et les phages T.

Article 1

Table I – p64	Characterization of the <i>E. coli</i> sensitive strains to PhiX174.
----------------------	--

Article 2

Figure I - p94	Bacteria and phages coexistence.
Table I – p95	Mutations found in the evolved and coevolved lines.
Figure II – p96	Viral concentrations in COEV and DIREV populations.
Figure III – p97	Lysis curves of the evolved viruses on the ancestor host.
Figure IV – p98	Lysis plaque sizes of the evolved viruses on the ancestor host.
Figure V – p99	Bacterial resistance and host range patterns.

ABREVIATIONS

β-Glc	β-glucoside
CFU	colony forming unit . Unité bactérienne à l'origine d'une colonie sur boîte de Pétri.
COI	coefficient d'infection (rapport entre la concentration virale sur bactérienne).
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats . Structure génétique bactérienne permettant notamment la résistance aux bacteriophages par insertion de séquence virale correspondante.
DO	densité optique .
Gal	galactose
Glc	glucose
Glc-Nac	N-acétylglucosamine
Hep	heptose
IJ	infective juice , solution de sels permettant l'adsorption de PhiX174 sur <i>E. coli</i> [solution mère de CaCl ₂ (0,5M) et MgCl ₂ (1M), diluée au millième pour l'expérimentation].
KDO	2-kéto-3déoxyoctonate .
LC	luria casein
LPS	lipopolysaccharide .
ONERBA	observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques .
PCR	polymerase chain reaction . Amplification spécifique d'une séquence d'ADN avec utilisation d'une polymérase.
PFU	plaque forming unit . Unité virale à l'origine d'une plaque de lyse sur un tapis bactérien.
RPM	révolutions par minute .
SSBP	single stranded binding protein . Protéine se fixant sur l'ADN simple brin.

INTRODUCTION

Dans l'étude bibliographique ci-après, je vous invite à explorer le monde invisible des microorganismes. Nous retracerons ensemble l'histoire de la découverte des bactéries et des virus. Puis, nous considérerons l'importance écologique de l'interaction bactérie - bactériophage. Nous étudierons, ensuite, la notion de coévolution antagoniste, les modèles théoriques et expérimentaux existants, et les paramètres déterminant l'évolution des deux protagonistes. Enfin, je vous présenterai le système expérimental *Escherichia coli* - PhiX174.

Dans un deuxième temps, je vous exposerai les différents volets de mon travail de thèse, ainsi que les résultats obtenus. A savoir l'étude de la niche écologique de PhiX174 ; de l'influence du génotype hôte sur la durée de coexistence *E. coli* - PhiX174 ; et du taux d'évolution de PhiX174 en coévolution continue avec *E. coli*.

Enfin, dans une dernière partie, et aux vues de ces résultats, nous discuterons d'une part des contraintes génétiques limitant la coévolution antagoniste entre la bactérie hôte *E. coli* et le bactériophage parasite PhiX174, et d'autre part des intérêts en écologie, pour l'industrie et la santé publique de l'étude de la coévolution bactérie-bactériophage et de ce qui peut être fait avec le modèle expérimental *E. coli* - PhiX174.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Découverte des bactéries et des bactériophages

1. Découverte des bactéries

La découverte des bactéries fait suite aux progrès réalisés en microscopie au XVIIIe. En 1676 Antonie Van Leeuwenhoek décrit des « animalcules », des petits animaux invisibles à l'œil nu, et notamment des bactéries. Au XVIIIe, Lazzaro Spallanzani a été le premier à montrer de façon expérimentale que les microorganismes ne naissent pas spontanément, mais proviennent de la contamination des infusions par l'air ou l'environnement. Il a également observé que certains se reproduisaient par scissiparité. Au XIXe, Louis Pasteur mit définitivement à bas la théorie de la génération spontanée, et découvrit le rôle des microorganismes dans les processus de fermentation et de putréfaction. Avec Robert Koch, Louis Pasteur démontra le rôle des agents infectieux dans certaines maladies, et particulièrement celui des bactéries, jetant les bases de leur prévention par l'hygiène et les vaccinations. En très peu d'années, les principaux germes bactériens des grands fléaux de l'humanité furent découverts : charbon, peste, lèpre, syphilis, tuberculose, et cholera. (15).

Aujourd'hui encore, les bactéries sont souvent étudiées dans une perspective anthropocentrique, c'est-à-dire en se focalisant sur quelques espèces causant des pathologies, ou d'autres utiles en industrie. Cependant, au XXe siècle on a aussi fait des avancées considérables en écologie bactérienne, et on perçoit aujourd'hui l'importance des bactéries dans les réseaux trophiques des différents écosystèmes.

2. Découverte des virus et des bactériophages

La découverte des virus est liée, elle, à la mise au point de techniques de filtration permettant de purifier les eaux de boisson. En 1884, Charles de Chamberland, un collaborateur de Louis Pasteur, proposa de nouveaux filtres en porcelaine, qui pouvaient être calibrés avec des pores homogènes et de taille variable. On pouvait alors évaluer la taille approximative des microbes les traversant, et c'est ainsi qu'en 1892, Dimitri Iwanowski découvrit le premier virus, celui de la mosaïque du tabac. Les champignons et les bactéries étaient retenus par les filtres aux pores les plus fins, alors que les virus invisibles au

microscope passaient à travers ces filtres et demeuraient infectieux. Karl Mayer confirma en 1899 qu'il s'agissait d'un être « vivant » qui se multipliait et n'était donc pas une toxine.

En 1957 André Lwoff les définit ainsi : « les virus sont des objets biologiques de nature corpusculaire, doués de continuité génétique grâce à un ADN ou un ARN constituant son génome, dépourvus de systèmes enzymatiques capables d'assurer leurs synthèses et devant, de ce fait, emprunter à la cellule infectée sa machinerie bioénergétique pour se faire répliquer en un très grand nombre d'exemplaires » (15). Pour ce qui est des bactériophages, virus parasitant les bactéries, il est admis aujourd'hui qu'ils aient été découverts indépendamment par deux microbiologistes, l'anglais Frederick Twort et le franco-canadien Félix d'Hérelle.

En 1915, Frederick Twort remarqua sur ses boîtes de Pétri des colonies de Staphylocoques à l'aspect vitreux, dont le repiquage restait infructueux. Il constata que les colonies de Staphylocoques de morphotype sauvage devenaient transparentes si on les touchait avec la substance des colonies vitreuses. Il ne vit rien au microscope qui puisse expliquer ce phénomène, et nota seulement que le principe actif pouvait traverser les filtres de Chamberland tout en conservant cette propriété lytique. Frederick Twort conclut qu'il pouvait s'agir d'un virus, d'une petite bactérie, d'une amibe ou encore d'une enzyme produite par la bactérie ce qui conduirait à son autodestruction. Il publia ses résultats dans *The Lancet* en 1915 (15).

A la même époque, Félix d'Hérelle, qui travaillait à l'Institut Pasteur à Paris, est amené à étudier des cas très sévères de dysenteries chez des soldats revenant du front. (110). Il se demanda si le bacille qu'il isola, *Shigella dysenteriae*, suffisait pour induire la maladie ou si un autre élément lui était associé. Schweinitz et Dorset, en 1903, avaient montré en effet que ce n'était pas la bactérie retrouvée chez les malades du choléra qui était responsable de la maladie, mais un agent pathogène qui traversait les filtres et lui était associé (une toxine ici). Félix d'Hérelle analysa alors les filtrats des bouillons de culture ensemencés avec les bacilles isolés des patients ; et il observa que certains filtrats pouvaient induire la lyse des autres bouillons. Il vérifia l'absence de bactéries dans ces filtrats, et se pencha alors plus précisément sur cette substance antibactérienne. En 1917, Félix d'Hérelle publia, dans les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, un article intitulé « Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques » (40). Dans ce mémoire il décrit la formation de plages de lyse, ainsi que la nécessité de la présence des bactéries pour l'amplification de la substance

antibactérienne, et la spécificité de l'hôte. Il nota toutefois que « son parasitisme est strictement spécifique, mais s'il est limité à une espèce à un moment donné, il peut s'exercer tour à tour sur divers germes par accoutumance ». D'Hérelle appela ce microbe : « bactériophage ». En 1942, l'observation des bactériophages par Luria et Anderson avec les premiers microscopes électroniques, confirma qu'il s'agissait d'organismes particuliers, ce qui finit de lever les doutes de la communauté scientifique sur leur nature (44).

Il apparut par la suite que l'infection par les bactériophages pouvait entraîner, dans certains cas, outre la destruction des bactéries, la survie du virus dans la bactérie sans effets délétères autres que des résurgences lytiques régulières. Enfin dès 1925, Oskar Bail démontra que certaines souches de colibacilles produisent de façon continue des bactériophages (cf. p22).

II. Importance écologique de l'interaction bactérie - bactériophage

1. Importance numérique des populations bactériennes et phagiques

Si les bactéries et les virus sont des organismes invisibles à l'œil nu, ils sont cependant ubiquitaires, et l'on en trouve dans tous les biotopes terrestres. On estime qu'il y a environ 10^{30} cellules bactériennes sur Terre ($4 \cdot 10^7$ /g de sol, $1 \cdot 10^6$ /mL d'eau douce et dix fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines dans le corps humain). Par ailleurs, il y aurait 10 fois plus de virus que de bactéries, soit 10^{31} virus (entre 10^4 et 10^8 /mL d'eau marine, entre 10^8 et 10^{10} /mL de sédiments et environ 10^8 /g de sol). La majorité des virus sont considérés comme étant des bactériophages, puisque les bactéries sont les proies les plus courantes et que l'abondance des virus correspond fortement à celle des bactéries (25) ; on fait parfois l'amalgame entre l'ensemble des virus et les bactériophages. Si l'on considère qu'en moyenne un phage pèse 10^8 Daltons, l'ensemble des bactériophages de la planète représenterait donc une masse de 10^{14} g, soit l'équivalent d'un million de baleines bleues adultes (de 100 tonnes chacune) (7, 8) !

De par leur distribution, leur nombre, et la biomasse qu'ils représentent, bactéries et bactériophages méritent toute notre attention. Nous discuterons dans ce chapitre de la diversité des bactéries et des bactériophages, de la spécificité de l'interaction bactérie – bactériophage, et de l'impact de la lyse sur l'écologie et l'évolution des populations bactériennes et virales.

2. Ecologie bactérienne

a. Détection et diversité des bactéries de l'environnement

La différenciation au microscope des multiples espèces bactériennes est très limitée. En effet, les traits morphologiques ne suffisent pas à les distinguer les unes des autres. Il faut bien souvent les cultiver pour obtenir des caractéristiques physiologiques et biochimiques plus informatives. Or, cela pose un problème de sélectivité, car seules certaines bactéries peuvent pousser dans des conditions de laboratoire (0.1%), lesquelles ne sont donc pas représentatives des bactéries de l'environnement. A la fin des années 1970, Carl Woese a préconisé de classer les espèces vivantes grâce à leur ARN ribosomique, ce qui lui permit ensuite de rassembler tous les organismes dans « l'arbre du vivant » (Figure 1)(128). On a

alors proposé d'identifier les espèces bactériennes difficilement cultivables grâce à leur ARN_{16S}, et d'établir des phylogénies pour mesurer la distance évolutive les séparant. (93).

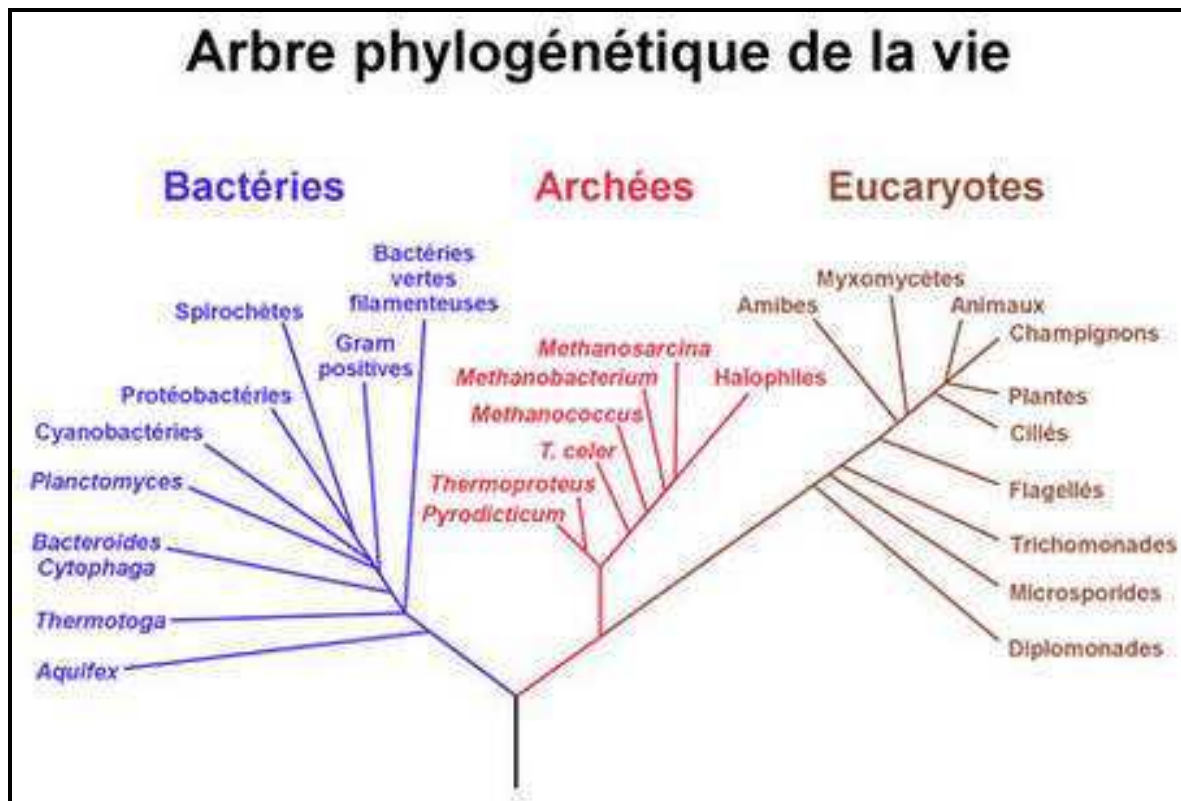


Figure 1 : Arbre phylogénétique du monde vivant.

Arbre construit en comparant les séquences d'ARN ribosomique (68).

Code couleur : En rouge les archées, en marron les eucaryotes, et en bleu les bactéries.

b. Un maillon essentiel des réseaux trophiques

A la fin du XIXe, la bactériologie environnementale consistait en l'étude de la survie des pathogènes dans l'eau. Puis, jusqu'au milieu du XXe, les chercheurs ont décrit les microorganismes de l'environnement (notamment marins), et leur distribution. Enfin, depuis les années 1975, on s'est intéressé au rôle des bactéries dans les biotopes (83). Les bactéries ne sont plus vues uniquement comme des « simples » décomposeurs et régénérateurs de nutriments, mais elles font partie intégrante des réseaux trophiques. Elles entretiennent des relations complexes de mutualisme, commensalisme, ou parasitisme avec d'autres procaryotes ou des eucaryotes, et sont elles-mêmes les cibles des protozoaires, et des bactériophages.

3. Ecologie virale

a. Détection des virus et diversité des bactériophages

Les bactériophages sont-ils aussi diversifiés qu'ils sont nombreux dans la biosphère ? Pour pouvoir estimer la diversité des bactériophages, et établir une taxonomie, il faut pouvoir les détecter de la façon la plus exhaustive possible, puis éventuellement les isoler et les cultiver pour les caractériser plus précisément.

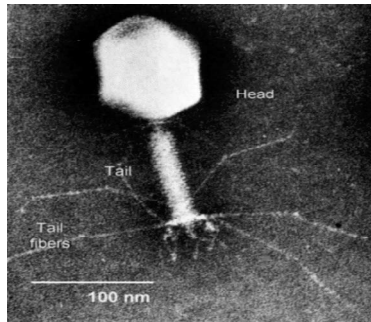
Pour déceler un phage donné, on a la possibilité d'introduire son hôte dans l'échantillon à tester, et d'attendre de voir s'il s'y produit de la lyse. L'hôte doit donc être connu et cultivable. Or, comme nous l'avons vu, il a été montré que la majorité des bactéries de l'environnement étaient non cultivables, ce qui limite fortement cette première approche. De plus, cette technique est restrictive puisqu'elle ne vise que les virus parasitant l'hôte mis en culture. Il existe d'autres méthodes ne nécessitant pas forcément la culture de l'hôte potentiel, comme par exemple la microscopie électronique, la cytométrie de flux, l'utilisation d'anticorps spécifiques, ou encore la génomique. Les prélèvements peuvent être concentrés de façon aspécifique (précipitation, centrifugation, filtration), ou bien spécifique avec une amplification sur un (ou plusieurs) hôte(s) potentiels.

La génomique est la méthode la plus exhaustive pour détecter les virus. Il n'existe pas de séquence équivalente à l'ARN ribosomique, utilisé pour différencier les bactéries et tous les organismes dits « vivants », qui soit conservée chez l'ensemble des virus et permette de les détecter systématiquement. Toutefois, on retrouve des séquences spécifiques des différents groupes de virus. On recherche donc les traces de ces séquences qu'on amplifie séparément, cela permet de remonter aux groupes de virus présents dans les échantillons analysés. Le polymorphisme de ces séquences est ensuite utilisé pour mesurer la diversité à l'intérieur de ces groupes (25). Cependant cette approche ne permet pas de découvrir des nouveaux groupes de virus puisqu'il faut avoir d'avance une séquence qui les caractérise. C'est pourquoi, il a été proposé d'étudier les métagénomomes de virus. Les données obtenues sont quantitatives, et permettent d'estimer le nombre de génotypes et leur abondance relative dans un environnement. Les résultats sont surprenants : près de 5000 génotypes viraux différents dans 200L d'eau marine, jusqu'à 1 million par kilo de sédiment marin et entre 160 et 1200 dans l'intestin humain (25, 35).

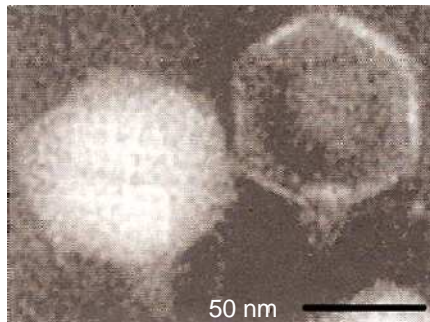
b. Taxonomie des virus

L'International Committee on Taxonomy of Viruses, ou ICTV, est un comité qui travaille sur un système de classification et une nomenclature virale reconnues à l'échelle internationale. La taxonomie proposée est hiérarchisée en ordres (3), familles (56), sous-familles (9), genres (233) et espèces (1550) ; une espèce virale étant définie comme « une classe de virus de type polythétique constituant une lignée répliquative et occupant une niche écologique particulière ». L'espèce PhiX174, par exemple, est du genre *Microvirus*, de la famille des *Microviridae*. La classification repose sur des critères physico-chimiques : la nature du génome (ADN ou ARN, simple ou double brin), la présence ou l'absence d'une enveloppe, la symétrie et les particularités de la capsid (Figure 2). Cette classification des virus n'est pas aujourd'hui intégrée à celle reliant les trois domaines des êtres vivants. En effet, contrairement aux Archées, Bactéries, et Eucaryotes qui eux descendent d'un ancêtre commun, l'origine des virus reste énigmatique et sujet à controverse (55). Il semblerait même qu'elle puisse être polyphylétique. Du reste, on ne connaît pas les liens phylogénétiques entre les différentes familles de bactériophages. Au sein d'un groupe réunissant les virus ayant une même symétrie de capsid, il est probable que les virus aient plusieurs origines et que ce trait phénotypique ne soit qu'une convergence.

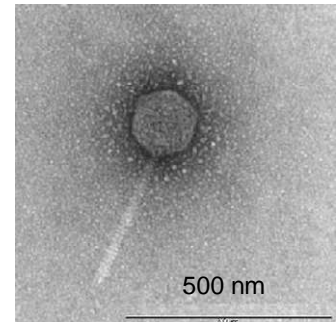
Phages à ADN double-brin



Phage T4

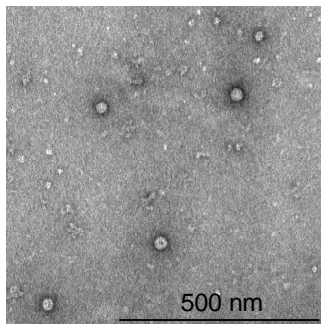


Phage T7

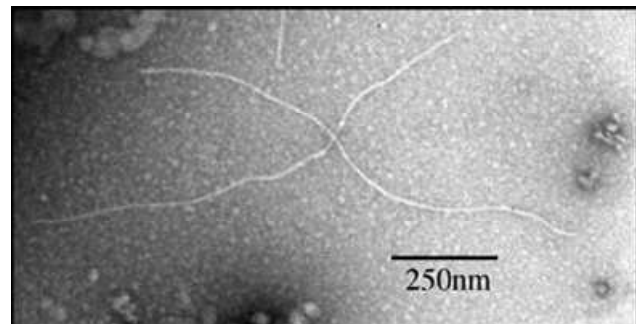


Lambdaïde

Phages à ADN simple-brin

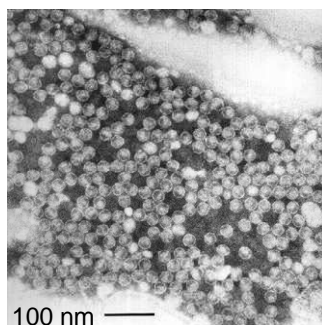


PhiX174



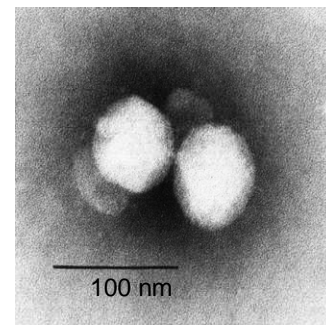
M13

Phage à ARN simple-brin



MS2

Phage à ARN double-brin



Phi6

Figure 2 : Diversité des bactériophages.

Photos de microscopie électronique : phage T4 (4), phage T7 (51), phage lambdaïde (photographie prise avec Ariane Bize d'Avezac à l'Institut Pasteur), phage PhiX174 (photographie prise avec Ariane Bize d'Avezac à l'Institut Pasteur), M13 (1), phage MS2 (2), phage Phi6 (3).

En 2002, Robert A. Edwards et Forest Rohwer, ont proposé un arbre protéomique des bactériophages (Figure 3) (46, 99). Cet arbre a été reconstruit à partir des génomes complets de 105 virus, soit 3981 protéines potentielles. Il semblerait que l'ajout de nouveaux génomes ne bouscule pas la répartition des groupes de virus trouvés par l'ICTV. Mais près de 20% de ces nouveaux génomes ne correspondent pas à un branchement déjà connu, ce qui laisse penser qu'il reste de nombreuses familles de virus à caractériser. Ceci est parfaitement illustré par l'étonnante diversité des virus infectant les Archées qui a été découverte très récemment (19).

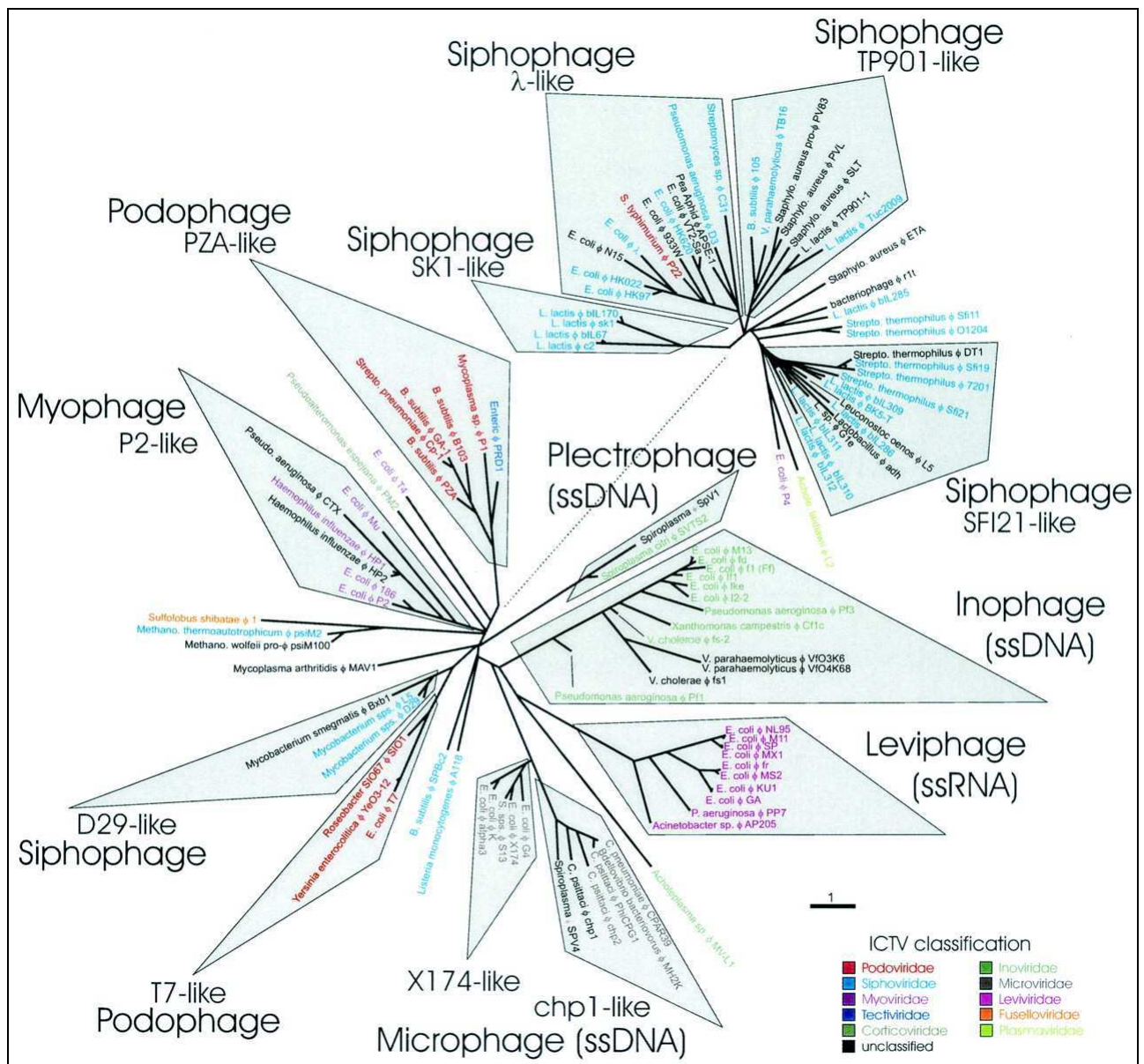


Figure 3 : Arbre protéomique reliant les bactériophages.
Arbre construit par Robert A. Edwards et Forest Rohwer (99).

c. Cycle de vie des bactériophages : bactériophages virulents et bactériophages tempérés

Au sein des virus, les bactériophages se caractérisent par des cycles de vie en interaction directe et obligatoire avec les bactéries qu'ils infectent.

Tous les bactériophages ont une phase d'adsorption à la cellule hôte, puis soit ils pénètrent entièrement dans la cellule, notamment s'ils sont enveloppés (ex : Phi6), soit ils injectent leur génome à travers la membrane bactérienne. Ensuite, selon qu'ils sont virulents ou tempérés, ils entrent dans une phase productive, ou dans une phase de latence (Figure 4).

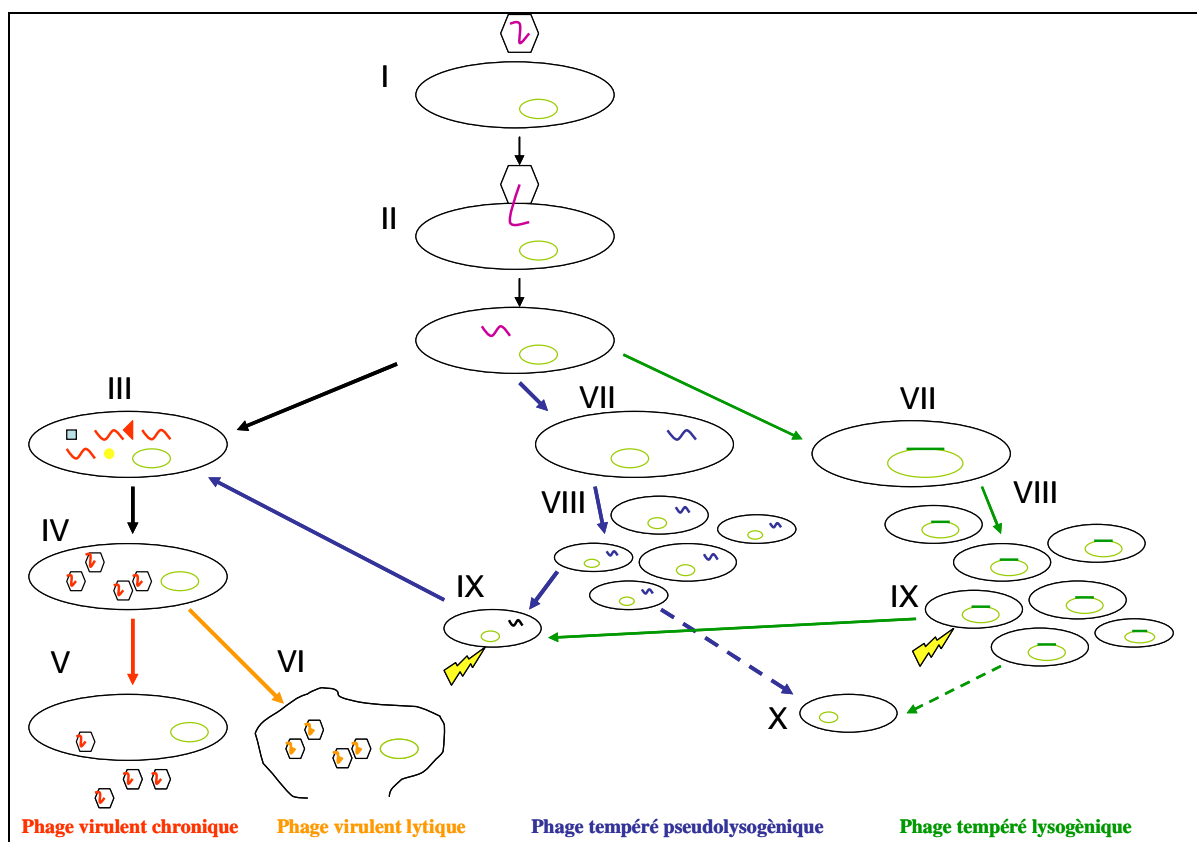


Figure 4 : Cycles de vie des bactériophages.

- I Adsorption
- II Injection du génome
- III Réplication, transcription, traduction virale
- IV Assemblage des (pro)virions
- V Sortie par bourgeonnement ou extrusion
- VI Lyse
- VII Génome viral « dormant »
- VIII Transmission verticale
- IX Réactivation du virus (stress environnemental)
- X Perte du génome viral

Les génomes des bactériophages virulents sont répliqués, transcrits et traduits après leur entrée dans la cellule. Les génomes et capsides néoformés des (pro)virions s'assemblent et la nouvelle génération de bactériophages sort de la cellule hôte, soit par bourgeonnement ou extrusion, c'est à dire sans tuer la cellule (bactériophages virulents chroniques, ex : M13), soit en lysant la cellule (bactériophages lytiques, ex : PhiX174).

Les génomes des bactériophages tempérés, eux, sont intégrés (bactériophages lysogéniques, ex : λ) ou non (bactériophages pseudolysogéniques, ex : P1) au génome bactérien. Ils sont répliqués avec le génome hôte et transmis verticalement aux nouvelles générations bactériennes, ils sont dits « dormants » ou encore « prophages ». Le génome viral peut-être perdu au cours d'une division cellulaire. Il peut aussi être ré-activé, notamment en cas de stress environnemental (UVs, pauvreté du milieu extérieur) et entrer dans un cycle productif lytique (33). Les bactériophages tempérés lysogènes ou pseudolysogènes peuvent réprimer l'activation du cycle lytique, et assurer ainsi leur transmission verticale d'une génération bactérienne à l'autre. Ce faisant, ils empêchent les bactériophages tempérés du même type d'infecter la bactérie hôte, et lui apportent donc une certaine immunité contre ces bactériophages apparentés.

La lysogénie et la pseudolysogénie peuvent être vues comme des stratégies sélectionnées chez les virus leur permettant une transmission verticale. Si les hôtes sont trop rares ou bien si les conditions environnementales limitent fortement la survie des particules virales libres, alors le maintien du génome viral dormant dans un génome bactérien peut être sélectionné. Les bactériophages tempérés représenteraient plus ou moins 1% de la population des virus des océans ; leur induction spontanée est relativement faible entre 10^{-2} et 10^{-5} bactériophages par bactérie par génération (35). On considère que 40% des bactéries marines sont lysogènes (58). Cela n'est pas limité aux bactéries marines, puisque la plupart des souches d'*E. coli* séquencées portent des prophages ou des restes de prophages dans leur génome ; chez certaines souches on trouve jusqu'à 18 génomes de bactériophages constituant près de 10% du génome bactérien (90).

De même, le fait d'être lytique pourrait être sélectionné dans un environnement où la densité en hôte est importante. On considère par exemple que le phage virulent de *Streptococcus thermophilus*, qui décime les bactéries de l'industrie laitière, serait à l'origine un prophage qui aurait évolué pour être lytique en fermenteur (35).

L'intensité de la sélection agissant sur la stratégie, lysogène ou lytique, est fonction de la densité en hôte et de la probabilité de survie des bactériophages. L'impact des bactériophages sur l'écologie et l'évolution des populations bactériennes dépend de leur cycle de vie virulent ou tempéré, mais aussi de la spécificité de l'interaction bactérie – bactériophage (étendue du spectre d'hôte).

d. Spécificité d'hôte des virus

Les études de la diversité des virus révèlent que la plupart des espèces peuvent être retrouvées dans des biomes différents (12). Cela suppose soit qu'il existe des hôtes identiques dans les différents biomes, soit que les virus ne sont pas spécifiques d'un hôte et peuvent s'attaquer aux hôtes qu'ils trouvent dans un biome donné, ou encore que ces deux conditions sont réunies.

Or, on a longtemps considéré que les bactériophages avaient un spectre d'hôte étroit (une seule espèce bactérienne, ou même un seul sérotype), c'est-à-dire qu'ils n'infectent que des bactéries proches les unes des autres (7). Cela étant lié au fait que certains bactériophages ne reconnaissent que le récepteur très spécifique de leur hôte, et montrent peu (ou pas) d'affinité pour les récepteurs ayant une structure très légèrement différente. Cette stricte correspondance permet d'ailleurs d'utiliser certains bactériophages pour différencier leurs bactéries hôtes par lysotomie (cf. p-118).

Cependant, il a été montré que certains bactériophages ont un spectre d'hôte étonnement étendu (plusieurs genres bactériens) et peuvent être isolés très facilement de l'environnement (18, 70). Pour garantir le prélèvement des virus à large spectre, l'étape d'enrichissement peut se faire avec plusieurs hôtes.

Il est important de noter ici le fait que l'étendue du spectre d'hôte des bactériophages est un paramètre susceptible d'évoluer, en fonction notamment de la concentration et de la diversité de la population bactérienne. Dans certaines conditions, il peut y avoir adaptation d'un virus à un nouvel hôte, plus ou moins proche de l'hôte ancestral, avec ou sans perte de la capacité à lyser cet hôte ancestral. Cette aptitude qu'ont les bactériophages à étendre leur spectre d'hôte, n'est pas sans rappeler la capacité des virus à changer d'hôte, ce qui peut être à l'origine de nouvelles maladies virales humaines comme par exemple le HIV (virus du

chimpanzé), le SRAS (virus de la chauve souris), ou encore celui de la grippe A (H1N1V pourrait être d'origine porcine et/ou aviaire).

Cette possibilité de changer d'hôte est à la fois problématique (ex : expansion d'une épidémie), mais peut aussi être utilisée dans l'industrie (production de bactériophages sur des bactéries différentes de l'hôte de référence (18). Cette versatilité est surtout très importante si l'on considère que les bactériophages peuvent provoquer des échanges de matériel génétique entre les bactéries.

e. Transferts génétiques

Les bactériophages contribuent aux transferts horizontaux de gènes entre espèces bactériennes de façon indirecte en induisant le rejet d'acide nucléique bactérien par la lyse, lequel peut-être par la suite transféré à un autre organisme par transformation naturelle. De façon plus directe, les bactériophages peuvent apporter à l'hôte des fractions du génome de la cellule précédemment infectée, et encapsidées par erreur à la place de leur génome. C'est le mécanisme de la transduction généralisée qui permet des échanges génétiques de fragments d'ADN pouvant aller jusqu'à 200kb. Enfin les bactériophages lysogènes peuvent aussi « capturer » dans leur génome des gènes bactériens d'intérêt (résistance aux antibiotiques, gènes de virulence...) qu'ils peuvent par la suite propager au sein des espèces ou bien d'une espèce à l'autre (70, 121). De ce fait, les bactériophages participent à la diversification des espèces bactériennes.

Il est important de noter ici que les opérons bactériens et les modules composant les génomes des virus sont des groupes de gènes fonctionnels assez semblables qui peuvent se réarranger et s'échanger par recombinaison homologue ; d'ailleurs, on dit parfois que les génomes bactériens sont « en mosaïque ». La frontière entre les métagénomes bactériens et viraux est bien floue ; d'où la notion de « pool génétique » (63). Il résulte de ces transferts génétiques une forte dynamique au sein des génomes des microorganismes qui leur permet de répondre rapidement aux changements de l'environnement. Dans l'espèce *E. coli* par exemple, seuls environ 2000 gènes sont conservés entre toutes les souches sur les 4000-5000 gènes constituant leur génome (115).

Par ailleurs, les génomes des bactériophages sont eux aussi soumis à une influence bactérienne, notamment par le « biais de codon ». Les bactériophages les plus compétitifs sont ceux qui ont optimisé la traduction de leurs protéines, et tout particulièrement les capsides, en adaptant leurs séquences nucléotidiques à la disponibilité des ARN de transfert de l'hôte. Presque tous les bactériophages ont au moins un gène avec le biais de codon de leur hôte, même si la plupart de leurs gènes ne le sont pas (32).

4. Impact de la lyse par les bactériophages sur l'écologie bactérienne

a. Recyclage des nutriments et influence sur le climat

La lyse des bactéries par les bactériophages est massive : les bactériophages seraient responsables de 10 à 50% de la mortalité des bactéries des systèmes aquatiques (59). Compte tenu de l'importance numérique des populations bactériennes, cette prédation a un effet capital sur les communautés microscopiques et macroscopiques.

La lyse induit la dispersion des débris cellulaires dans le milieu marin, ce qui participe à la circulation des nutriments dans la chaîne alimentaire. Cela a aussi un impact sur la géochimie locale, de part les propriétés chimiques et physiques des éléments dispersés (58). Par exemple, la lyse par les virus conduit à la libération de sulfure de diméthyle (DMS), ce qui pourrait avoir une influence significative sur le climat. Le DMS est à l'origine de l'odeur caractéristique de l'air marin, mais au-delà de ses propriétés aromatiques, il exerce également un effet refroidissant sur le climat. Une fois oxydées dans l'atmosphère, les molécules de DMS forment un brouillard d'aérosols et participent à la formation de nuages. Ceux-ci agissent comme de véritables ombrelles en empêchant la pénétration d'une partie des rayons du soleil, limitant ainsi le réchauffement du globe (58).

b. Dynamique des populations phagiques et bactériennes

La lyse des bactéries par les bactériophages impacte fortement les populations bactériennes, et ce d'autant plus quand les bactériophages sont nombreux. Considérons dans un premier temps la dynamique des populations phagiques, puis celle des populations bactériennes qui en dépend.

La concentration en virus d'un milieu est un paramètre dynamique, fonction de leur survie, et de leur multiplication par l'infection. Dans les écosystèmes aquatiques le turn-over des virus serait extrêmement rapide, entre une heure et quelques jours (58). Les UVs participent à la dégradation des virus ; tous n'y sont pas sensibles de la même façon. En effet, il a été observé que certaines cellules hôtes ont une machinerie réparant les lésions de leur génome dues aux UVs. Quand elles sont infectées, elles peuvent ainsi réparer les lésions des génomes viraux. En conséquence dans ces zones éclairées, les virus peuvent mieux « supporter » les radiations que d'autres dans les zones plus sombres (58).

La croissance des virus dépend de la densité des bactéries ; l'hôte doit être à une concentration minimale pour qu'ait lieu la rencontre, les virus se déplaçant de façon passive. Or dans la nature, la plupart des espèces bactériennes ont moins de nutriments qu'au laboratoire et elles atteignent des densités souvent moins importantes. L'état physiologique dans lequel les bactéries se trouvent conditionne tout autant la réussite de l'infection, puisqu'il faut que l'hôte soit « infectable ». Or *in vivo* les bactéries seraient très fréquemment en phase stationnaire, et il a été observé que bien souvent, *in vitro*, les bactéries en phase stationnaire ne peuvent pas produire de virus (35). Les virus tempérés, comme nous l'avons vu précédemment, ont eux la possibilité d'infecter les bactéries qu'ils rencontrent, et de rester à l'état de dormance en attendant un changement de l'environnement qui permette leur multiplication.

Les virus les plus abondants dans les systèmes aquatiques ne représenteraient que 3 à 5% de la population virale totale, les autres étant encore moins fréquents (<0.01%) (25, 35).

Les dynamiques des populations virale et bactérienne sont étroitement liées. On considère que les bactériophages infectent préférentiellement les bactéries les plus compétitives, parce qu'elles dominent en nombre dans la population, et que la probabilité de les rencontrer est donc plus importante. La lyse de la population hôte dominante par un virus libère une niche qu'un nouvel hôte peut envahir. Un virus jusqu'ici faiblement représenté peut devenir abondant et inversement un virus jusqu'alors dominant diminuer drastiquement. C'est la théorie « Killing the winner » formulée par Thingstad et Lignell, en 1997 (113). Elle suggère qu'une grande partie de la diversité bactérienne serait générée et maintenue par la pression de sélection imposée par la présence des bactériophages, et ce malgré l'utilisation de ressources communes.

Pour résumer, les bactériophages, par la lyse, modifient la dynamique des populations bactériennes en libérant de nombreux nutriments dans l'environnement, en induisant de forts goulots d'étranglements, et en contribuant à la génération et au maintien d'une importante diversité d'espèces.

5. Evolution de l'interaction bactérie - phage

Nous ne pouvons pas étudier l'impact des populations phagiques sur les populations bactériennes, sans considérer que la très forte pression de sélection imposée par les bactériophages sur les bactéries favorise l'émergence de la résistance. Les bactéries ayant développé des stratégies d'évitement sont en effet sélectionnées. De même l'obligation de lyser les bactéries pour se multiplier induit une forte pression de sélection qui avantage les virus contournant les stratégies d'évitement développées par les bactéries.

La coexistence des bactéries et bactériophages repose donc sur le principe d'une évolution conjointe, dite coévolution antagoniste. Dans le cas du système bactérie/phage lytique, le parasite évolue pour rencontrer son hôte, survivre en association avec cet hôte et se multiplier à ses dépens (en entraînant la mort de l'hôte). Dans le même temps, l'hôte évolue pour échapper au parasite, et/ou s'en défendre.

Alors qu'il est délicat d'étudier la microévolution des systèmes naturels de par leur complexité (même si cela commence à être fait – (120)) cela peut être fait en laboratoire.

Pour suivre et comprendre la dynamique des génotypes se succédant dans les populations hôtes et parasites qui coévoluent, il a été proposé de formaliser l'évolution des deux protagonistes à l'aide d'équations mathématiques, et de tester ensuite la validité de ces modèles d'évolution théoriques en comparant les résultats ainsi obtenus à ceux engrangés grâce à l'expérimentation au laboratoire. Dans le chapitre suivant, nous discuterons de ces modèles théoriques et expérimentaux.

III. La coévolution antagoniste bactérie – virus

1. Infectivité, productivité, virulence et résistance

Avant toute chose, définissons ici les termes suivants : infectivité, productivité, virulence et résistance.

Nous utiliserons le terme « **infectivité** » du phage pour parler de sa capacité à reconnaître une bactérie et à initier l'infection. Au laboratoire, on mesure l'infectivité par l'étendue du spectre d'hôte en croisant différents clones bactériens et viraux (issus d'une même population, de différentes populations ou encore de différentes générations), ainsi que par le taux d'adsorption à l'hôte.

Nous utiliserons le terme « **productivité** » du phage pour parler de sa capacité à se multiplier en l'infectant une bactérie. Plus le nombre de virus de deuxième génération produits est important et plus le virus est dit « productif ». Au laboratoire, on mesure la productivité par le nombre de virions de deuxième génération libérés après l'infection d'une unique bactérie (en anglais « burst size »), ainsi que par la taille des plages de lyse produites sur un tapis de bactéries sensibles et initiées par un virus unique.

Nous utiliserons le terme « **virulence** » du phage pour mesurer l'impact de l'infection du virus sur la population bactérienne. Notons qu'ici nous ne considérons que des virus lytiques, induisant donc systématiquement la mort de la bactérie, la virulence d'un phage se mesure donc par son impact sur la survie de la population toute entière. Au laboratoire, on quantifie la virulence à l'aide des caractéristiques de la courbe de lyse en milieu liquide.

Une bactérie résiste à un phage quand elle n'est pas reconnue par ce phage, ou qu'elle bloque une étape de son infection. La **résistance** est **partielle** quand la productivité du phage est seulement diminuée et elle est **totale** quand aucun virus de deuxième génération n'est produit. Ce phénotype de résistance peut-être **contournable** ou **absolu**, si un bactériophage pouvant infecter cette souche a été isolé ou non.

2. Théorie de « La Reine Rouge »

Nous l'avons vu, la coexistence des bactéries et des bactériophages repose sur le fait que les populations hôtes ont la capacité de répondre à la pression de sélection permanente liée à la présence des parasites, et inversement.

Pour illustrer ce processus dynamique, Leigh Van Valen formula en 1973 sa théorie dite de la « Reine Rouge » basée sur le fait que les interactions entre organismes conduisent à des courses évolutives permanentes. Elle tire son nom d'un épisode fameux du livre de Lewis Carroll : « *De l'autre côté du miroir* » (deuxième volet, d' « *Alice au pays des merveilles* »), au cours duquel Alice et la Reine Rouge se lancent dans une course effrénée. Alice demande alors : « *Mais, Reine Rouge, c'est étrange, nous courons vite et le paysage autour de nous ne change pas ?* » Et la reine répondit : « *Nous courons pour rester à la même place.* ». L'environnement se modifiant sans cesse, la sélection naturelle permet seulement aux êtres vivants de conserver leur degré d'adaptation. Les espèces ne sont pas plus « évoluées » pour ce qui est du rapport de forces.

Nous discuterons dans un premier temps, des deux modèles théoriques principaux : le modèle « gène pour gène » et le modèle « aux allèles correspondants ». Dans un deuxième temps, nous présenterons les systèmes biologiques existants. Enfin, dans un troisième temps, nous listerons les différents paramètres « clés » susceptibles d'influencer le cours de la coévolution.

3. Des modèles théoriques pour illustrer la coévolution antagoniste

a. Modèle « gène pour gène »

Dans un modèle « gène pour gène » (« gene for gene » en anglais) multilocus, on considère qu'il y a x gènes chez l'hôte qui permettent de résister aux parasites, et y gènes chez le parasites qui permettent de contourner la résistance de l'hôte. Un parasite est d'autant plus infectieux qu'il a de gènes contournant la résistance de l'hôte et l'hôte est d'autant plus résistant qu'il a de gènes permettant de faire avorter l'infection par le parasite. Pour expliquer qu'un parasite super infectieux et qu'un hôte super résistant n'envahissent pas rapidement la population, on associe un coût physiologique à chaque gène d'infectivité/résistance. Donc plus le parasite/hôte a de gènes d'infectivité/résistance, et moins il est compétitif. Dans ce modèle il suffit que le parasite ait un gène d'infectivité qui ne soit pas contré par un gène de

résistance chez l'hôte pour que l'infection ait lieu. La coévolution « sature » quand l'avantage apporté par la mutation (probabilité plus importante d'échapper au parasite pour l'hôte ou le contraire pour le parasite), est moins important que le coût physiologique engendré par cette mutation. Alors face à un « super parasite » qui aurait accumulé un maximum de gènes d'infectivité, les bactéries qui résistaient aux virus d'infectivité intermédiaire ne sont plus avantagées. Le fort coût physiologique payé par la succession des gènes de résistance accumulés fait qu'elles sont contre sélectionnées, et que les bactéries sensibles au virus ancestral plus compétitives se maintiennent dans la population. De même, le « super parasite » n'a plus d'avantage à contourner toutes les résistances qu'il ne rencontre plus, et donc les parasites de moindre infectivité et plus compétitifs persistent eux aussi dans la population. Ainsi entre une population hôte et une population parasite il peut y avoir tout d'abord une course à l'armement, qui s'essouffle et peut atteindre un état d'équilibre. (9, 102). Les parasites qui évoluent selon ce modèle d'évolution « gène pour gène », tendent à devenir généralistes, c'est-à-dire qu'ils infectent un spectre d'hôte de plus en plus large.

Nous pouvons représenter les génomes bactériens et viraux par une suite de 4 gènes **ABCD** pour les bactéries, et **abcd** pour les bactériophages. Chaque gène peut prendre une valeur 0 ou 1, suivant s'il correspond à un allèle sensible ou non-infectieux (allèle 0), ou à un allèle résistant ou infectieux (allèle 1). Si le système évolue suivant un modèle évolutif « gène pour gène », alors les bactériophages ne peuvent lyser les bactéries que s'ils ont un nombre d'allèles d'infectivité supérieur au nombre d'allèles de résistance (Figure 5).

		Génotypes bactériens ABCD			
Génotypes viraux abcd		0000	0100	1100	1101
	1000	Lyse			
	1010	Lyse	Lyse		
	1011	Lyse	Lyse	Lyse	
	1111	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse

Figure 5 : Modèle théorique d'évolution « gène pour gène ».

Un gène bactérien peut être un allèle sensible (0) ou résistant (1). De même, un gène viral peut être un allèle non-infectieux (0), ou infectieux (1).

b. Modèle « aux allèles correspondants »

Alors que dans le modèle « gène pour gène » différents gènes d'infectivité peuvent contourner différents gènes de résistance, on considère que dans le modèle « aux allèles correspondants » (« matching alleles » en anglais) il doit y avoir stricte correspondance entre les gènes d'infectivité et ceux de résistance de l'hôte. Dans ce modèle on n'associe pas de coût physiologique aux gènes d'infectivité/résistance. Il n'y a pas accumulation non plus de gènes d'infectivité/résistance, (donc pas de « super parasite »), mais il peut y avoir un polymorphisme dans les populations bactériennes et virales, avec une répartition en fréquence inversement proportionnelle à la pression de sélection agissant sur les différents génotypes. Les parasites qui évoluent selon ce modèle d'évolution « aux allèles correspondants », tendent à devenir spécialistes, c'est-à-dire qu'ils infectent un spectre d'hôte restreint. Decaestecker et coll. ont montré qu'avec le système antagoniste *Daphnia magna* (crustacé) et *Pasteuria ramosa* (bactérie), on avait une évolution dynamique de type « aux allèles correspondants », avec une stricte correspondance entre un génotype hôte et un génotype parasite, et une adaptation relativement rapide du parasite à son hôte avec perte de son pouvoir infectieux sur les générations passées (43). Dans ce même article, les auteurs discutent du fait que des gènes distincts peuvent contribuer à la valeur sélective du parasite et à son infectivité, et ils suggèrent que ces gènes pourraient évoluer séparément et suivre l'un ou l'autre des deux modèles théoriques « gène pour gène » ou « aux allèles correspondants » (43).

Reprenons le formalisme des génomes bactériens **ABCD** et viraux **abcd**. Selon le modèle évolutif « aux allèles correspondants », les bactériophages ne peuvent lyser les bactéries que si au moins un allèle d'infectivité n'est pas contré par un allèle de résistance (Figure 6).

		Génotypes bactériens ABCD			
Génotypes viraux abcd		1011	0110	1101	0111
	0100	Lyse			
	0001		Lyse		
	0010			Lyse	
	1000				Lyse

Figure 6 : Modèle théorique d'évolution « aux allèles correspondants ».

Un gène bactérien peut être un allèle sensible (0) ou résistant (1). De même, un gène viral peut être un allèle non-infectieux (0), ou infectieux (1).

c. Un continuum de possibilités d'évolution, du modèle « gène pour gène » au modèle aux « allèles correspondants »

Agrawal, et Lively comparent les deux modèles « gène pour gène » et « aux allèles correspondants », et les présentent comme les extrémités d'un continuum de possibilités (9). Ils traduisent en équations un modèle intermédiaire, en paramétrant sa distance aux deux précédents modèles. Dans ce modèle-ci, les parasites lysent préférentiellement l'hôte correspondant, mais aussi partiellement les hôtes auxquels il pourrait avoir accès avec le modèle « gène pour gène ». En se déplaçant le long du continuum, on passe graduellement d'un système composé de plusieurs spécialistes, évoluant avec une dynamique « aux allèles correspondants », à un système où des spécialistes coexistent avec des généralistes et des parasites au spectre d'hôte intermédiaire, jusqu'à un système où il n'y a plus que des généralistes, évoluant avec une dynamique « gène pour gène ».

Il existe encore une alternative aux deux modèles « gène pour gène » et « aux allèles correspondants » : la possibilité d'adapter l'un d'eux au système biologique étudié pour coller au plus près de ce qui est observé. C'est ce que proposent Forde et coll., dans une étude sur *E. coli* B et les bactériophages T7. Ils modifient les équations du modèle « gène pour gène », afin de tenir compte du fait que le virus coévolué lyse toujours aussi bien l'hôte ancestral, et de moins en moins bien les hôtes de plus en plus coévolus, alors que dans le modèle « classique », on considère que le virus coévolué perd aussi en virulence sur l'hôte ancestral (54).

L'entreprise de biotechnologies Danisco travaille à l'optimisation des souches bactériennes utilisées dans les fermenteurs de l'industrie laitière. Ils ont récemment découvert un mécanisme de résistance des bactéries aux bactériophages, basé sur l'accumulation de séquences virales dans des structures bien particulières, les CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)(13). Les séquences virales s'intègrent les unes à la suite des autres, et confèrent à la bactérie une résistance aux bactériophages porteurs de ces mêmes séquences. Dans une étude en 2008, Andersson et Banfield ont pu rattacher les virus à leurs hôtes grâce à ces séquences de CRISPRs. Ils ont trouvé que la recombinaison est intensive et qu'elle permet aux virus de contourner la résistance des bactéries. Seuls les séquences insérées les plus récemment correspondent à des virus coexistants avec les bactéries. Cela suggère que le mécanisme est très dynamique. Nous pourrions considérer qu'il s'agit d'un exemple intermédiaire entre le modèle « gène pour gène » et « aux allèles

correspondants », puisqu'il y a à la fois accumulation de résistance par la bactérie, mais nécessité d'une stricte correspondance pour qu'elle soit effective (11).

Ces modèles théoriques, ont été traduits en équations, et utilisés pour générer des données simulant la dynamique des génotypes se succédant dans la population. Ils ont été validés en comparant les données simulées aux résultats obtenus en expérimentation. Ils permettent à présent d'approcher la dynamique d'évolution des génotypes dans des systèmes biologiques nouveaux.

Dans des conditions de laboratoire favorables (milieu riche, aération, contrôle de l'agitation et de la migration), nous pouvons nous attendre à obtenir des cycles rapides de coévolution antagoniste, et observer la succession des génotypes bactériens et phagiques. C'est ce qui a été fait avec les modèles expérimentaux présentés ci-dessous.

4. Les systèmes bactérie – bactériophage expérimentaux « classiques »

a. E. coli B et les bactériophages T

Les premiers systèmes expérimentaux de coévolution antagoniste bactérie-bactériophage ont été décrits à la fin des années 1970. Levin et Chao étudiaient alors la coévolution entre la souche B de *E. coli* et les bactériophages T (21). Notons, qu'il n'existe pas de lien phylogénétique connu entre les bactériophages T, ils ont cependant tous une capsid icosaédrique un ADN double brin et une queue.

1. T4

En faisant coévoluer *E. coli* B et le phage T4, différentes mutations de résistance peuvent émerger. Un coût de la résistance a été observé, lequel varie avec la mutation, l'environnement (richesse du milieu, température), et le contexte génétique. Les mutations les plus profondes au niveau du récepteur ont un coût physiologique plus important sur *E. coli* B. Ce coût est susceptible d'évoluer, ainsi Lenski (76, 77) observa qu'il diminuait de 50% en 400 générations en absence de bactériophages et cela sans qu'il y ait à nouveau sensibilité au phage ancestral. Il a même constaté que les mutations compensatoires émergentes pouvaient aussi augmenter la valeur sélective des bactéries sensibles ancestrales.

Il n'a pas été observé de virus T4 pouvant contourner ces résistances. Un équilibre s'établit alors entre les souches d'*E. coli* B sensibles, les souches résistantes, et le phage T4.

2. T7

La durée de la coévolution entre *E. coli* B et le phage T7 dépend de la nature des mutations de résistance émergentes. Il a été observé que les mutations du récepteur conférant la résistance d'*E. coli* B à T4, la rendent souvent résistante à T7. Cependant, contrairement à T4, le phage T7 peut contourner certaines mutations de résistance, ce qui permet une « course aux armements » entre la résistance et son contournement. Les bactéries sensibles, les bactéries résistantes de première génération et celles de deuxième génération pouvant coexister avec les deux générations de bactériophages (34).

La coévolution paraît être asymétrique, en faveur des bactéries. En effet, certaines mutations ne semblent pas contournables par le virus, notamment quand le récepteur entier est perdu. Plusieurs choses peuvent alors arriver : soit les bactéries résistantes et sensibles coexistent avec les bactériophages, comme dans le cas de T4, soit les bactéries résistantes, dont le coût s'est amoindri au point de disparaître, envahissent la population, remplacent entièrement les bactéries sensibles et les bactériophages disparaissent alors, soit une mutation chez le phage peut finir par émerger, en modifiant sa spécificité de récepteur.

3. T2

Contrairement à T4 et T7, le phage T2 a deux récepteurs possibles sur *E. coli* B, dont celui de T4. La perte de ce récepteur réduit l'infectivité de 50%, ce qui s'apparente à une résistance « partielle ». A partir de ce mutant semi résistant, il est facile d'isoler des bactéries résistant pleinement à T2.

Comme pour T7, des virus T2 contournant la résistance ont été observés, ainsi que des bactéries résistantes de seconde génération, mais pas des virus pouvant infecter celles-ci.

4. T5

Il semblerait qu'*E. coli* B puisse résister à T5, sans que cela n'implique un coût de résistance. De plus, on n'a pas observé de phage T5 pouvant contourner cette résistance. Cela expliquerait le fait qu'on ait observé l'extinction totale des bactéries sensibles et des

bactériophages. Ce phage T5 est très utile, en tant que contre exemple pour l'étude du compromis entre résistance et croissance. De plus, on peut se demander comment un tel virus subsiste dans la nature. Soit il est en voie d'extinction, soit dans certaines autres conditions la résistance aurait un coût, aussi minime soit-il, ou encore *E. coli* n'est pas son hôte préférentiel dans la nature.

b. E. coli O157:H7 et son phage

E. coli O157:H7 est une souche pathogène pouvant entraîner des infections intestinales sévères. Cette bactérie se retrouve généralement à l'intérieur des intestins de bovins et donc dans les produits de consommation (viande hachée). Cette souche perd son pouvoir pathogène à haute température. Le fait de pouvoir éventuellement contrôler l'occurrence de cette souche dans le tube digestif de l'animal, en utilisant un phage qui lui est spécifique (PP01) est donc très intéressant.

La possibilité d'une coévolution antagoniste dynamique entre le phage PP01 et *E. coli* O157:H7 en chémostat a été étudiée. Différents mutants de résistance bactériens et des bactériophages avec un spectre d'hôte élargi ont été observés. Une coévolution, de type course à l'armement est donc possible entre les deux organismes (85). Il faut donc tenir compte du fait que les bactéries *E. coli* O157:H7 peuvent résister au phage PP01 en mettant en place un protocole de phagothérapie.

c. E. coli et un mutant lytique du phage Lambda

Spanakis et Horne, en 1987 proposèrent un modèle expérimental de coévolution avec *E. coli* et λ vir, qui est un mutant strictement lytique de λ (phage tempéré lysogénique) (109). Les bactéries résistent en modifiant leur récepteur à λ vir, lequel sert aussi à l'utilisation du maltose. L'intérêt de leur système vient du fait que l'on peut sélectionner les bactéries sensibles au phage, puisqu'elles sont les seules à croître sur du maltose.

Bien que les bactéries résistantes dominant rapidement dans la population, des bactéries qui ne résistent que partiellement permettent le maintien de la population virale. L'émergence de bactéries résistantes, au récepteur modifié, a entraîné la sélection de virus contournant cette résistance et qui s'accrochent plus fortement au récepteur. En 2008, ces résultats sont repris par Forde et coll., qui suggèrent que ce système coévolue selon le modèle

« aux allèles correspondants », selon une sorte de mécanisme clé-serrure, où les bactériophages s'adaptent continuellement au récepteur (54).

d. *Pseudomonas fluorescens* et son phage *Phi2*

En 2001, Buckling et Rainey proposèrent le système *P. fluorescens* SBW25 et son phage SBW25Phi2 (28). Ils vérifièrent que les deux protagonistes peuvent coexister pendant plus de 300 générations bactériennes, et ils démontrèrent qu'il y a bien coévolution antagoniste entre eux, que celle-ci est durable, directionnelle, selon un modèle « gène pour gène », et divergente d'une population à l'autre.

Dans une étude de 2007, Buckling et coll. montrent que le taux de mutation des bactéries coévoluées est significativement augmenté, et que ce trait phénotypique est sélectionné pendant la coévolution antagoniste malgré un fort coût associé (91).

e. *P. syringae* et *Phi6*

Chao et Lythgoe, ont travaillé sur le système expérimental *P. syringae* pv. Phaseolicola - Phi6. Ils ont montré que la coexistence des deux protagonistes pouvait être durable et qu'elle dépendait du moment où émergent les mutants bactériens résistants (avant inoculation du phage). Cette date détermine leur fréquence relative dans la population. Ils n'ont pas observé de « coût de la résistance » dans leurs conditions de manipulations.

Leur système est pertinent puisque la majorité de la génétique qui soutient l'interaction bactérie – phage et la résistance est connue. Ils ont donc la possibilité de relier phénotype et génotype (82).

5. Limitations de la coévolution antagoniste

Aux vues de tous ces résultats expérimentaux, il semblerait qu'on ait, avec la plupart des systèmes bactéries – bactériophages, une course à l'armement, pouvant être plus ou moins longue. Nous traiterons ici des différentes contraintes physiologiques, génétiques, et écologiques expliquant que les protagonistes fassent des compromis entre l'optimisation de tel ou tel trait d'interaction et leur valeur sélective, ainsi que le ralentissement de la coévolution.

Considérons dans un premier temps les contraintes physiologiques. Chez les bactéries, notamment *E. coli* dans le cas des bactériophages T, le récepteur reconnu par les virus pour l'infection est le lipopolysaccharide LPS exposé à la surface de la membrane. En modifiant leur récepteur, ou même en le supprimant, les *E. coli* peuvent empêcher l'adsorption des virus, et donc leur résister. Toutefois cela a un coût physiologique important, puisque ces récepteurs ont aussi un rôle dans le métabolisme. Les bactéries résistantes sont ainsi moins compétitives que les bactéries sensibles ; d'où la notion de « coût physiologique de la résistance » (22). On a toutefois trouvé des contre-exemples, où la résistance ne semble pas être associée à une baisse de la valeur sélective de la bactérie (ex. T5 et Phi6 (21, 82)). Il est difficile de savoir si cela est vérifié dans les milieux naturels, ou si cette observation est spécifique des conditions de culture au laboratoire.

De manière analogue aux bactéries, il existerait une relation positive entre le taux de multiplication et le taux de mortalité des virus : les virus dont le taux de multiplication est le plus rapide seraient aussi plus vite dégradés une fois à l'extérieur de l'hôte (42). Cela se traduit par un coût de l'infectivité/virulence, qui empêche un super parasite d'émerger. Les mécanismes à l'origine de ce compromis ne sont cependant pas clairs.

Considérons dans un deuxième temps les contraintes génétiques. Chez certains virus comme PhiX174 par exemple, la taille du génome serait contrainte par le volume de la capside (101), ce qui limite les possibilités d'insertions de nouvelles séquences nucléotidiques. De plus, le fait que le génome ait une petite taille, avec dans le cas de PhiX174 des superpositions de gènes, limite le nombre de mutations possibles, et induit une épistasie plus importante (interaction entre les mutations). Ces contraintes peuvent conduire les virus à optimiser une étape du processus infectieux, au détriment d'une autre. Elles sont plus facilement mises en évidence chez les bactériophages qui ont des petits génomes, mais peuvent aussi affecter des organismes qui ont un génome de taille plus importante. Reprenons ici l'exemple de la résistance bactérienne par accumulation de séquences virales dans la structure CRISPR. La pression de sélection pour esquiver la résistance bactérienne est si forte que les mutations dans les locus correspondant aux séquences intégrées vont être sélectionnées. La différence entre la séquence récupérée par la bactérie et celle modifiée du phage, lui permet de contourner la résistance, mais peut être associée à un fort coût. En effet, les mutations dans les séquences codantes étant souvent délétères, il est en conséquence fort

probable que ce processus d'évitement des résistances de type CRISPR résulte à long terme en une baisse de la valeur sélective du phage pouvant entraîner son extinction.

Enfin, considérons dans un troisième temps les contraintes écologiques. La richesse du milieu conditionne la taille des populations et donc la probabilité de rencontre entre bactéries et bactériophages. Ainsi le fait de ne pas observer l'émergence de la résistance à un phage ou son contournement ne signifie pas que celle-ci est impossible, mais que les conditions de l'expérimentation au laboratoire n'ont pas permis sa sélection ou bien que l'échelle de temps n'est pas adaptée (28).

6. Situation d'équilibre

Les contraintes limitant la coévolution antagoniste peuvent conduire à une situation d'équilibre. Par exemple, le coût physiologique associé à la résistance suffit parfois à expliquer la coexistence des bactéries et bactériophages. En effet, les bactéries sensibles plus compétitrices que les bactéries résistantes peuvent persister dans le milieu et permettre la multiplication des virus (78). Dans leurs travaux publiés en 1977, Chao et coll. ont montré qu'il y avait coexistence de bactérie de première génération *E. coli*⁰ sensibles aux virus T7⁰ de 1^{ère} génération, des bactéries *E. coli*¹ résistantes aux T7⁰, mais sensibles aux T7¹, et des bactéries *E. coli*² résistantes aux bactériophages T7⁰ et T7¹. Ainsi plusieurs générations de coévolués peuvent être présents simultanément et assurer une certaine pérennité aux bactéries et bactériophages (34).

Cet équilibre est limité dans le temps ; dès qu'un paramètre évolue, comme la richesse du milieu, les perturbations physiques ou la possibilité de migrer, le potentiel évolutif d'au moins un des deux protagonistes est modifié et cela peut relancer la coévolution (26).

7. Paramètres déterminants pour la dynamique de coévolution

Une fois les modèles théoriques d'évolution validés, et les systèmes biologiques mis en place, on peut déterminer quels facteurs ont un rôle prépondérant sur le dynamisme de la coévolution (ou l'équilibre) entre bactéries et bactériophages, en testant l'influence de telle ou telle variable présentées ci-après.

a. La valeur des coûts de résistance/virulence

Pour expliquer que les phénotypes résistants n'envahissent pas la population, nous avons vu qu'il faut intégrer une notion de « coût physiologique » de la résistance. Or la valeur de ce coût est fonction de la mutation, du contexte génétique (53), ainsi que de l'environnement abiotique et biotique. Il modifie le taux de reproduction et la compétitivité d'un individu qui envahit (ou non) plus ou moins rapidement la communauté. La structure et l'équilibre de la communauté sont alors modifiés, ainsi que leur capacité à répondre à un changement de l'environnement, comme par exemple le contournement de la résistance par le virus (21).

b. Taille et densité de la population hôte

Comme nous venons de le voir, le coût lié à la résistance des bactéries dépendant de la richesse du milieu ; dans les milieux pauvres, la pression de sélection favorisant les bactéries plus compétitives (sensibles) est plus forte que dans les milieux riches. En outre, la concentration en ressources d'un milieu conditionne la densité maximale en hôte, et donc la probabilité de rencontre bactérie – bactériophages, puisque ceux-ci se déplacent passivement. Enfin, une taille de population plus importante augmente la variabilité génétique et permet donc l'émergence d'un plus grand nombre de mutants de résistance bactériens. Pour ces trois raisons, quand la quantité de ressources augmente dans le milieu, la pression de sélection est plus importante pour les bactéries (qui rencontrent plus fréquemment les bactériophages), l'émergence des résistantes favorisée, et le coût de la résistance plus supportable à cause de l'excès de ressources (81).

A l'occasion de mon master 2, j'ai travaillé sur la coévolution antagoniste entre *E. coli* C et PhiX174 sur gradient de ressources (84). Et j'ai observé que la coexistence bactérie - bactériophage était plus longue aux concentrations intermédiaires. C'est pourquoi, comme nous le verrons par la suite, j'ai choisi de diluer le milieu riche LC au quart pour maximiser la durée de coévolution.

c. La compétition entre parasites pour un même hôte

S'il y a une compétition entre les hôtes sensibles et résistants, il peut aussi y avoir une compétition entre les parasites, à la fois à l'extérieur de la cellule bactérienne, et à l'intérieur de l'hôte.

Un phage peut infecter une bactérie déjà parasitée (superinfection) ; on considère alors que les différents bactériophages présents à l'intérieur de l'hôte sont en compétition puisqu'il faut qu'ils détournent l'un et l'autre la machinerie cellulaire pour assurer leur multiplication. Pour ne pas avoir à tenir compte de cette compétition intra-hôte qui peut-être complexe (117), dans la plupart des travaux expérimentaux sur des systèmes bactéries/bactériophages lytiques, on choisit un coefficient d'infection faible (COI, rapport entre le nombre de particules virales et bactériennes), et on fait l'hypothèse que la superinfection est ainsi négligeable. En effet, à l'intérieur de l'hôte il peut y avoir de la recombinaison entre les différents génomes infectants, et on peut choisir de l'éviter (56, 116).

L'intensité de la compétition entre bactériophages est fonction de la densité en bactéries. Selon la probabilité de rencontre avec un hôte sensible, les parasites favorisés sont généralistes ou spécialistes. Les avantages des bactériophages généralistes sont nombreux : un large spectre qui diminue la compétition intraspécifique pour un même hôte, moins de temps pour trouver un hôte, et une plus grande probabilité d'infection « réussie » sur un hôte sensible. Cependant, malgré tous ces avantages, on observe que les parasites sont plus souvent des « spécialistes » que des « généralistes ». Cela peut-être expliqué, au moins en partie, par l'existence d'un compromis entre l'étendue du spectre d'hôte et la qualité de l'infection sur chacun des hôtes possibles. Ainsi, généralement, les prédateurs se spécialisent sur un petit nombre d'hôtes « rentables », à moins que leur nombre soit trop faible. Ce compromis entre la valeur sélective des différents virus et leur pouvoir infectieux, explique la coexistence de différents génotypes phagiques (38, 62).

d. La structuration de l'espace

Les populations hôtes et parasites dans les milieux naturels sont organisées dans l'espace, en sous populations distinctes, reliées parfois par de la migration. Au laboratoire on a la possibilité de contrôler la migration, notamment en faisant co-évoluer bactéries et bactériophages dans des populations parallèles, sans que les contaminations ne soient possibles. C'est ce qui a été fait avec le système *P. fluorescens* et son phage. Les auteurs ont alors observé qu'à partir d'un unique couple de génotypes, ils ont obtenus des phénotypes coévolus divergents. C'est donc que la structuration de l'espace est un facteur de diversification important. (28).

e. Agitation et perturbations physiques

L'agitation d'un milieu où bactéries et bactériophages coexistent en sous-populations distinctes, modifie la pression de sélection imposée par les parasites. En effet, les bactéries qui s'organisent en biofilm à la surface d'un matériau organique ou inerte peuvent échapper aux bactériophages, d'où la notion de « refuges spatiaux » (21, 78). A faible fréquence, l'agitation augmenterait le taux de transmission des parasites, et empêcherait les bactéries d'échapper aux bactériophages en constituant des biofilms. C'est ce que montrent Brockhurst et coll., dans une étude expérimentale ; ils font coévoluer des bactéries et des virus en milieu statique, et ils agitent régulièrement (une minute toutes les 29 minutes) ; ils obtiennent que le taux de coévolution est augmenté par l'agitation (27). A forte fréquence, ou bien si l'agitation est continue, l'espace est déstructuré (homogène) et la coévolution devrait être similaire en tout point du milieu.

f. La migration

La migration, se traduit par un flux directionnel de génotypes bactériens et/ou viraux d'une sous-population à l'autre. Son impact sur la dynamique de la coévolution dépend de l'intensité du flux. Une migration « moyenne » entraîne un apport continu en hôte sensible, augmente la diversité génotypique des hôtes et parasites, et permet la fixation locale des génotypes les plus résistants et infectieux. En ce sens, elle peut augmenter le taux de coévolution. Alors qu'une « trop forte » migration peut diminuer ce même taux, en homogénéisant génétiquement les sous-populations, et en empêchant la fixation des génotypes mêmes avantageux.

Dans un travail à la fois expérimental et théorique, Morgan et coll. ont étudié l'impact de la migration des hôtes et/ou celles des parasites sur la dynamique de coévolution (86). Ils ont montré que quelque soit son taux, la migration des parasites leur confère un avantage qui fait qu'ils infectent mieux les populations hôtes locales. Alors que la migration des hôtes ou l'absence de migration a peu d'effet sur la dynamique de coévolution.

On pense communément que les parasites ont une plus grande rapidité d'évolution que les hôtes (plus grands effectifs, et plus courts temps de génération), et qu'ils devraient être par conséquent localement adaptés à leurs hôtes. Or le travail précédent semble indiquer le contraire, en montrant que les bactériophages sont maladaptés localement en absence de

migration. Avec le modèle expérimental *P. fluorescens* et son phage, Buckling et Rainey font la même constatation, c'est à dire qu'en absence de migration les bactéries sont adaptées localement aux bactériophages, et non l'inverse. Ils proposent l'idée que parfois (et notamment avec leur système), la vitesse d'évolution des parasites n'est pas plus rapide que celle de leurs hôtes (bactéries et bactériophages ont à peu près le même temps de génération, et peuvent être à des concentrations équivalentes dans certaines conditions), ce qui expliquerait que les parasites bénéficieraient davantage de l'apport de diversité génotypique par la migration (28). Enfin, il a été suggéré, que les parasites ont un nombre moins important de possibilité d'évolution que les hôtes à cause de leur plus petite taille de génome, et que cela participe à ralentir leur vitesse d'évolution.

Toujours en ce sens, Brockhurst et coll., ont mesuré l'impact de la migration des hôtes sur la dynamique de la coévolution, en faisant varier l'apport en hôtes sensibles dans un milieu où bactéries et bactériophages coexistent. Ils obtiennent que la résistance des bactéries est maximale pour un taux de migration intermédiaire, et que cela correspond à un taux de coévolution minimal. Ils expliquent cela par le fait que le taux de coévolution est augmenté uniquement quand la migration permet de redonner l'avantage aux parasites (26).

Nous l'avons vu, la migration peut, dans une certaine mesure, augmenter le taux de coévolution en modifiant le potentiel évolutif du protagoniste « dominé » en absence de migration. Cela se vérifie aussi dans le cas d'une compétition entre parasites pour un même hôte. Ainsi, dans une étude où Coderly et ses collaborateurs ont mis $\alpha 3$ et PhiX174 en compétition sur *E. coli*, il a été montré que $\alpha 3$, qui en absence de migration "perdait" face à PhiX174, bénéficiait davantage de la migration que PhiX174 (38).

En conclusion, pour étudier la coévolution antagoniste avec un système expérimental bactérie - bactériophage, il semble important de connaître ou de contrôler la valeur des paramètres ci-dessus.

IV. Le système expérimental *E. coli* – PhiX174

Dans un premier temps, je présenterai l'hôte bactérien, *E. coli*, et nous discuterons plus précisément de la structure de son lipopolysaccharide membranaire, lequel sert de récepteur au phage PhiX174.

Dans un deuxième temps, je présenterai le bactériophage parasite, PhiX174.

Enfin, dans un troisième temps, j'indiquerai ce qui a déjà été fait sur ce système expérimental, et ce que nous avons choisi d'étudier.

1. *E. coli*

E. coli est une bactérie Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Découverte en 1885 par Théodore Escherich dans des selles de nourrissons, elle est communément trouvée dans la flore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Le génome d'*E. coli* est circulaire, et il mesure environ 5 millions de paires de bases. La comparaison des génomes d'*E. coli* révèle une grande diversité qui assure un remarquable potentiel évolutif et se traduit par la versatilité de cette espèce. Ainsi la plupart des souches d'*E. coli* sont commensales et constituent l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie intestinale. Toutefois, certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes, pouvant entraîner des gastro-entérites sévères, infections urinaires, méningites, ou septicémies ; on estime que plus de 80% des infections urinaires communautaires seraient causées par *E. coli* (87). La pathogénicité des souches d'*E. coli* vient de l'expression des gènes dits « de virulence » qui leur permettent de coloniser de nouvelles niches écologiques et/ou de contourner les mécanismes de défense de l'hôte.

En règle générale, les infections à *E. coli* sont traitées par antibiothérapie. Cependant la sensibilité des différentes souches d'*E. coli* aux différents antibiotiques est très variable et l'évolution vers la résistance est actuellement un problème qui s'aggrave en pratique clinique. Ainsi, en 2008, l'Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) a estimé que 43% des germes d'*E. coli* résistaient à l'amoxicilline, (6). Certaines souches d'*E. coli* portent des plasmides de multirésistance et elles peuvent transférer ces plasmides à d'autres espèces, notamment quand elles se trouvent à l'intérieur d'un biofilm.

Puisqu' *E. coli* est sensible à certains bactériophages (les coliphages, ex : PhiX174, T4 et lambda), il a été proposé de traiter certaines infections par la phagothérapie. Si cela est en effet appliqué dans les pays d'Europe de l'Est, ce genre de traitement est toujours en cours d'études avant validation dans les pays occidentaux (cf. p-120).

Enfin, les souches d'*E. coli* en passant d'hôte en hôte se retrouvent dans l'eau et le sol ; leur capacité à survivre dans le milieu extérieur fait d'elles des organismes indicateurs des pollutions fécales de l'environnement (37).

a. Microorganisme modèle au laboratoire et outil en biotechnologie

Au laboratoire, les souches d'*E. coli* se divisent toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche et oxygéné. Cette rapidité de croissance, la facilité avec laquelle on peut modifier leur génome, ainsi que l'accumulation des connaissances sur *E. coli* sont autant d'avantages qui font de cet organisme l'un des plus étudiés à ce jour, et l'un des outils indispensables en biotechnologie industrielle.

b. Le lipopolysaccharide LPS d'E. coli, récepteur de PhiX174

Le lipopolysaccharide, ou LPS, est un composant majeur de la membrane externe de la paroi des entérobactéries. Il est composé de trois entités: le lipide A, partie fortement conservée et enchâssé dans la membrane externe, le noyau, partie très peu variable, et l'antigène O, région hypervariable qui permet de différencier des sérovars au sein de l'espèce *E. coli*. Le lipide A confère au LPS sa toxicité (endotoxine) (112).

Les bactéries portant des LPS complets, contenant donc les trois parties, sont dites «*smooth* » (ou lisses), elles produisent des colonies rondes et brillantes à surface bombée et lisse, avec des marges bien délimitées sur milieu solide. En sérum physiologique (0,85 % NaCl), ces colonies donnent une suspension stable avec une turbidité homogène. Or, il existe des bactéries qui portent des LPS incomplets, sans antigène O. Elles sont dites «*rough* » (ou rugueuses). Ces bactéries-ci donnent des colonies à marges irrégulières et ondulantes, avec une surface rugueuse et plate. En sérum physiologique, ces colonies ne donnent pas de suspension stable et homogène, car les bactéries s'auto-agglutinent. Dans le cas où l'antigène O est absent et que le noyau est aussi modifié, les bactéries sont dites «*deep-rough* ». Ces mutants ne peuvent survivre *in vitro* que dans des conditions bien particulières (112). Les «*deep-rough* » ont, en effet, un taux de croissance réduit, sont hypersensibles aux détergents

et antibiotiques hydrophobes (10). Leur mobilité est modifiée (67), ainsi que leur capacité à conjuguer (105, 107), et leur virulence est atténuée (14); la membrane de ces souches « deep rough » est déséquilibrée (119). Enfin, il a été démontré qu'en l'absence du lipide A, la bactérie ne peut pas survivre *in vitro* (mutants létaux).

Le LPS, ou plus exactement la partie centrale du LPS (noyau) est reconnue par PhiX174, c'est pourquoi nous nous concentrons ici sur sa structure et sa biosynthèse.

Le noyau du LPS est lui-même composé de deux régions : le noyau interne, et l'externe. Le noyau interne est lié de façon covalente au lipide A par l'intermédiaire d'un sucre : le 2-keto-3-déoxyoctonate (KDO), et sa structure générale est fortement conservée chez les bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *Salmonella enterica* ont le même). Sur ce sucre, sont accrochés trois heptoses (Hep) souvent modifiés par l'addition de groupes phosphate, pyrophosphate ou diphosphoéthanolamine (112). Le noyau externe a une structure plus variable que le noyau interne. Il est composé d'hexoses ordinaires, comme le glucose, le galactose ou la N-acétyl-glucosamine, lesquels peuvent aussi être modifiés.

Jusqu'à présent, seulement cinq structures de noyaux (R1 à R4 et K-12) ont été identifiées chez *E. coli*. Les différences entre ces cinq structures sont essentiellement localisées au niveau du noyau externe, la structure R1 étant la plus fréquente (112), et c'est la structure du noyau du LPS d'*E. coli* C, la souche communément utilisée au laboratoire pour l'amplification de PhiX174.

c. Biosynthèse du noyau interne du LPS

La biosynthèse du lipide A et du noyau du LPS est un processus séquentiel dans lequel chaque enzyme catalyse la formation du substrat pour l'enzyme suivante.

Les gènes encodant ces enzymes sont presque tous rassemblés au locus *rfa* (ou *waa*) (situé à environ 82 minutes sur le chromosome d'*E. coli*), *rfaE*, *lpcA* et *gmhB* sont eux localisés à des endroits distincts du génome. Ce locus *rfa* comprend trois opérons nommés d'après le premier gène du transcriptome : *gmhD*, *rfaQ* et *rfaA*. L'opéron *gmhD* (*rfaDFCL*) est nécessaire à la biosynthèse du noyau interne (Figure 7). L'opéron *rfaQ* (*rfaQGPOTYWVL*) contient les gènes encodant les enzymes du noyau externe (Figure 7). L'opéron *rfaA* contient le gène *rfaA* (ou *kdtA*) codant pour la transférase Kdo et le gène *coaD* (*kdtB*) qui,

paradoxalement, ne joue aucun rôle dans la synthèse du LPS (Figure 7). Enfin, dans l'opéron *gmhD*, le gène *rfaL* code pour une ligase responsable du rattachement de l'antigène O.

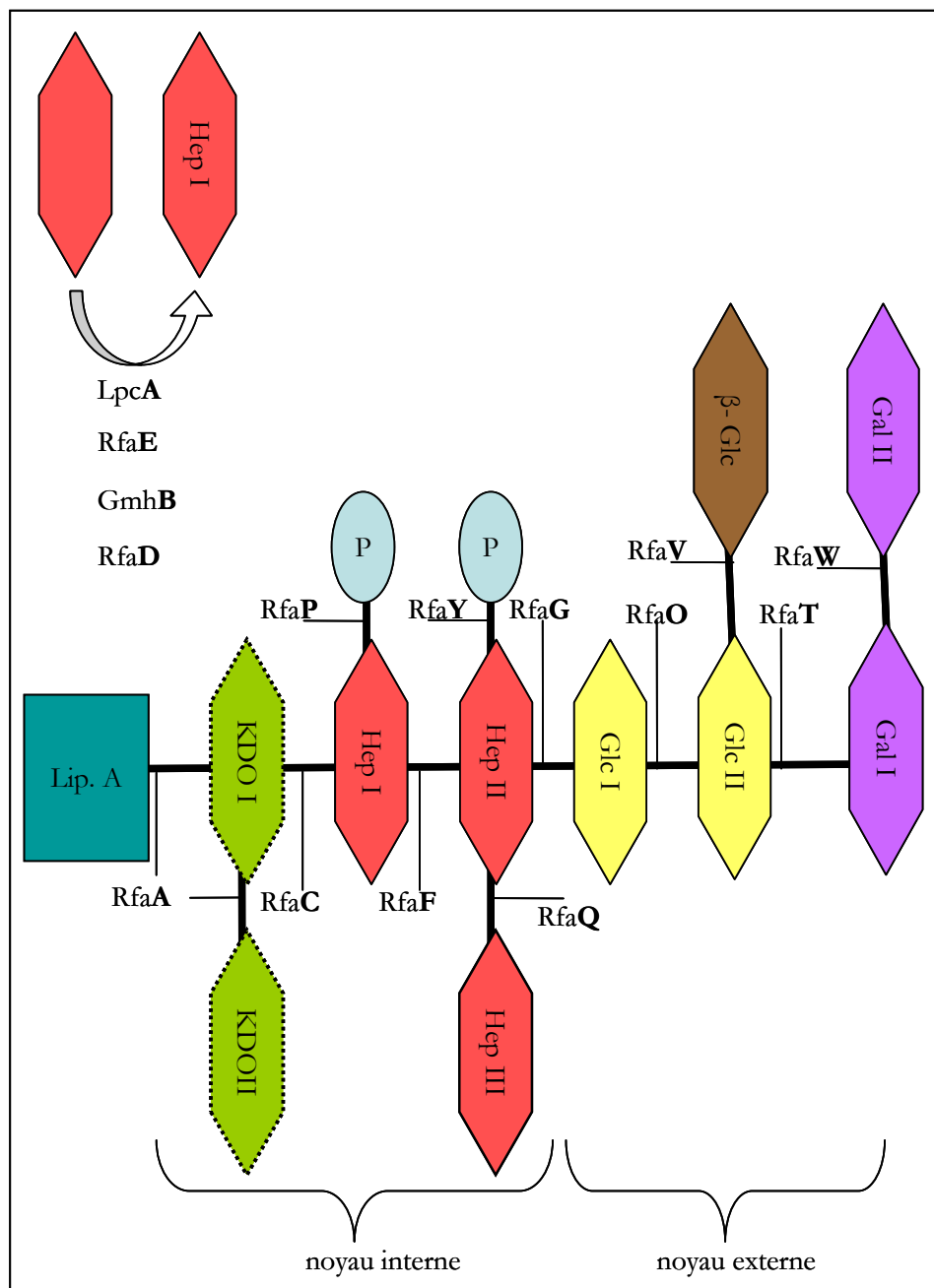


Figure 7 : Biosynthèse du noyau du LPS d'*E. coli* C.

Lip.A : lipide A, Gal : galactose, Glc : glucose, β -Glc : β -glucoside, P : phosphate, KDO : 2-keto-3-deoxyoctonate.

En haut à droite sont indiquées les enzymes participant à la biosynthèse du premier heptose. Au centre, des enzymes de l'opéron *rfa* sont rattachées à l'étape de la biosynthèse du LPS à laquelle chacune participe.

Enfin, une accolade rassemble les sucres du noyau interne du LPS, et une autre ceux du noyau externe.

Les heptoses du noyau interne sont le résultat d'une cascade de réactions enzymatiques. Interviennent successivement une isomérase (codée par le gène *gmhA*), une ADP-heptose synthase (gène *hldE*), et enfin une épimérase (gène *hldD*). Deux heptosyltransférases (codées par les gènes *rfaF* et *rfaC*) accrochent ensuite les heptoses sur le complexe lipide A -KDO₂ (74). Les variations dans la composition des hydrates de carbone du noyau externe font que la façon dont sa biosynthèse se déroule est différente selon la souche bactérienne. Dans le modèle d'*E. coli* à noyau de type R1, les gènes nécessaires pour la synthèse du noyau externe sont situés dans l'opéron *rfa- QGPOTYWVL*.

d. Le LPS d'E. coli C et sa sensibilité à PhiX174

Nous l'avons dit, *E. coli C* est l'hôte le plus communément utilisé pour amplifier le bacteriophage PhiX174, et le noyau de son LPS est de type R1 (Figure 7). Il a été montré que des mutations distinctes au niveau du noyau ont un impact différent sur la reconnaissance par PhiX174. La délétion du galactose terminal rend la souche résistante (*rfaW*) (52), alors que la délétion du glucose terminal (*rfaV*) en diminue seulement la sensibilité (52, 95). De plus, la délétion du 3^{ème} heptose du noyau interne (*rfaQ*) n'affecte pas la sensibilité à PhiX174 (94). Chez les souches de *S. typhimurium* sensible à PhiX174, le noyau externe du LPS n'est pas le même que celui d'*E. coli C*, avec des hexoses et des branchements différents. (69). On a donc suggéré que c'est plus la conformation globale du LPS, que sa composition précise qui intervient pour la reconnaissance de l'hôte par PhiX174 (52). De plus, il a été dit que la présence d'un antigène O pouvait empêcher l'infection, ce qui fait que le spectre d'hôte sensibles potentiels est limité (64). En effet, les souches « rough » ne représenteraient que 3 à 24 % des bactéries isolées selon les études d'épidémiologie, et la méthode choisie pour le sérotypage (50, 57).

2. PhiX174

a. PhiX174, un petit Microviridae lytique

Le bactériophage PhiX174 a été isolé pour la première fois en 1935 par Bulgakov et Sertic dans les eaux des égouts de Paris. Depuis ce jour, il n'a de cesse d'étonner, notamment pour sa petite taille, et d'être utilisé pour des expérimentations pionnières. En effet, il a été le premier génome d'ADN simple brin séquencé par Sanger en 1977 (5), et l'un des premiers génomes construits *de novo* à partir de fragments d'ADN synthétiques en 2003 (108).

PhiX174 est un phage de la famille des *Microviridae*, du genre des *Microvirus*. Les virus de la famille des *Microviridae* infectent les procaryotes et ont un ADN circulaire simple brin et une capsidie icosaédrique. Ils ressemblent beaucoup aux virus de la famille des *Circoviridae* qui eux, infectent les eucaryotes. Les trois quarts des virus de cette famille appartiennent au genre *Microvirus*. Les trois autres genres de la famille des *Microviridae* sont les *Bdellomicrovirus*, *Chlamydiamicrovirus*, et *Spiromicrovirus* (66). On peut rapprocher les *Microviridae* des *Inoviridae* (M13), qui ont eux aussi un ADN circulaire simple brin positif (identique à la séquence de l'ARNm), mais qui, une fois leur ADN répliqué, circularisé, et empaqueté dans une capsidie, utilisent un mécanisme d'extrusion pour sortir de la cellule, sans la tuer et s'entourent ainsi d'une enveloppe glycolipidique.

Presque tous les virus de la famille des *Microviridae* sont lytiques, et forment donc des plages de lyse sur un tapis bactérien sensible. Le rendement moyen de l'infection d'une bactérie par un virus unique est d'une centaine de virus de seconde génération (42).

b. Occurrence et niche des Microvirus

Dans leur étude globale de la diversité virale marine, Angly et coll., (12), ont été étonnés de trouver que près de 6% des virus étaient des *Microviridae* dans les prélèvements de la Mer des Sargasses, alors qu'ils n'ont pas retrouvé de séquences de cette famille au large de la Colombie Britannique, ni dans le Golfe du Mexique. La niche des *Microviridae* est en effet relativement petite, puisque Rokyta et coll. en 2006 ont trouvé que seuls 3.5 % des virus de l'environnement qui peuvent lyser *E. coli* sont des *Microviridae* (100).

Les *Microvirus* ont pour hôtes des *Enterobacteriaceae* ; ils infectent presque tous *E. coli* C ; $\alpha 3$ infecte aussi *E. coli* B ; PhiK, St-1 et U3, eux, n'infectent qu'*E. coli* K-12 (75). Dans une étude Crill et coll. ont montré que PhiX174 accumule des mutations sur le gène *F* quand il est adapté à l'hôte *S. enterica*, et qu'il ne peut alors plus lyser *E. coli*. Ces mutations sont reversées quand on force PhiX174 à lyser à nouveau *E. coli* (39). Les différences de spectre d'hôte des *Microviridae* seraient liées à la variabilité des séquences des gènes de capsidie *F*, *G*, *H* (75).

c. Caractérisation physique de PhiX174

La structure de PhiX174 a pu être établie en 3D par microscopie cryoélectronique. Sa capside icosaoédrique mesure entre 22 et 33 nm suivant l'axe choisi. Elle est formée par un assemblage précis de 4 sortes de protéines G, F, H et J (qui interagissent avec son ADN) (Figure 8).

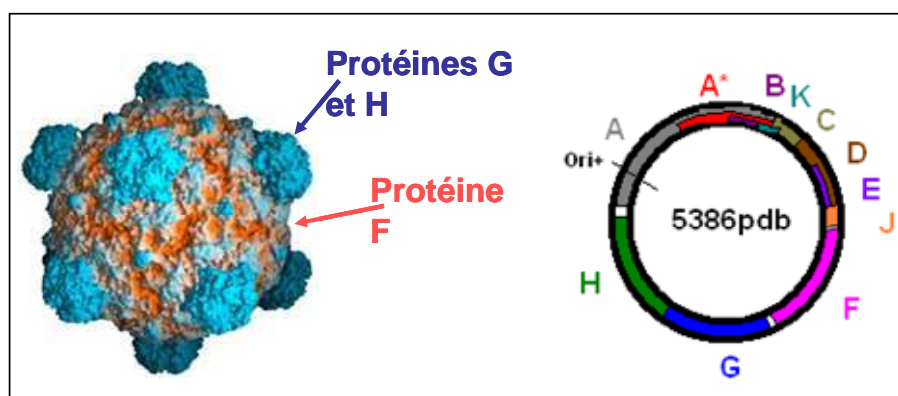


Figure 8 : Capside et génome de PhiX174.

Reconstruction de la capside obtenue par informatique (104).

Distribution et superposition des gènes de PhiX174 sur son génome.

En spectre de masse, PhiX174 est composé à 27% d'ADN et 73% de protéines. Il absorbe au maximum à la longueur d'onde 260nm, et le ratio A260/A280 est de 1,55, alors qu'une capside vide a un ratio de A260/A280 de 0,90.

PhiX174 a besoin d'ions Ca^{2+} pour s'attacher à son hôte *E. coli*. On a même vu grâce à la cristallographie, le changement de conformation induit par les ions Ca^{2+} qui est nécessaire à l'infection(65). Comme la plupart des virus, PhiX174 ne perd pas son infectivité au contact du chloroforme, ni des détergents, et il est stable à un pH compris entre 6 et 9. Par contre, PhiX174 est plus sensible aux radiations, et notamment aux UVs, que les bactériophages qui ont un ADN double brin, puisque son génome est constitué d'ADN simple brin.

d. Génome de PhiX174

La taille des gènes et leur nombre varient chez les *Microviridae* : entre 4421 (SpV4 - *Spiromicrovirus*) et 6087 ($\alpha 3$ - *Microvirus*) ; PhiX174 ayant lui un génome de 5386 nucléotides (Figure 8).

Le génome de PhiX174, est composé d'un ADN circulaire simple brin positif. Tous les *Microviridae* ont des gènes qui se chevauchent, les trois cadres de lectures pouvant être utilisés. On note que les protéines de capsides sont regroupées.

Il a été suggéré que l'évolution de PhiX174 soit contrainte par la taille de sa capside, il pourrait toutefois supporter jusqu'à 200 nucléotides supplémentaires (101).

e. Reconnaissance du LPS des bactéries sensibles

Voici ce que l'on lit dans l'ouvrage de référence : « PhiX174 s'attache aux cellules hôtes via un sucre du LPS » (51). Les bactéries qui ne produiraient pas le « bon » LPS seraient résistantes à PhiX174. Les 6 résidus qui constituent le site d'accrochage de PhiX174 sur la molécule sucrée spécifique du LPS, seraient très conservés parmi les coliphages de la famille des *Microviridae* (51).

De nombreuses études ont été menées, notamment par Kashimura et coll., pour tester *in vitro*, le mécanisme de reconnaissance du LPS des souches sensibles par les protéines de capsides de PhiX174. Il a été montré que G et H s'accrochent plus fortement aux LPS des souches "rough", c'est à dire sans antigène O (Ra) qu'aux LPS au noyau externe ou interne tronqué (Rc, Rd2) (71), (72). Selon eux, la reconnaissance se ferait en deux temps, avec tout d'abord G et H qui reconnaissent grossièrement les parties hydrophobe et hydrophile du LPS, avant d'examiner plus précisément son noyau interne. L'accrochage au LPS induit un changement de conformation de G et H, qui permettrait l'injection de l'ADN viral dans la cellule. Ces études ont toutefois été faites avec des LPS d'*E. coli* libres et des protéines de capsides G et H marquées à l'histidine, ce qui pourrait biaiser les observations. En effet, la conformation du LPS est aussi dépendante de son ancrage dans la membrane (71).

Certains font l'hypothèse qu'il existe, non pas un, mais deux récepteurs à PhiX174, et que ce second récepteur serait nécessaire à la pénétration de l'ADN viral (51). Les photographies obtenues par microscopie électronique tendent à montrer que la majorité des particules de PhiX174 sont concentrées aux points d'adhésion entre la membrane externe et la membrane interne de la paroi bactérienne. Cela suggérerait que le second récepteur pourrait y être localisé, et que l'injection de l'ADN pourrait se faire à cet endroit, c'est à dire directement dans le cytoplasme. Un parallèle a été fait entre PhiX174 et les bactériophages à queues qui reconnaissent leur hôte en deux temps : le premier récepteur permet la

reconnaissance de l'hôte potentiel, puis le virus « marche » à la surface de la cellule, jusqu'à ce qu'il trouve un deuxième récepteur pour pénétrer dans la cellule. Ici, PhiX174 « roulerait », puisqu'il n'a pas de queue.

f. *Son cycle de vie*

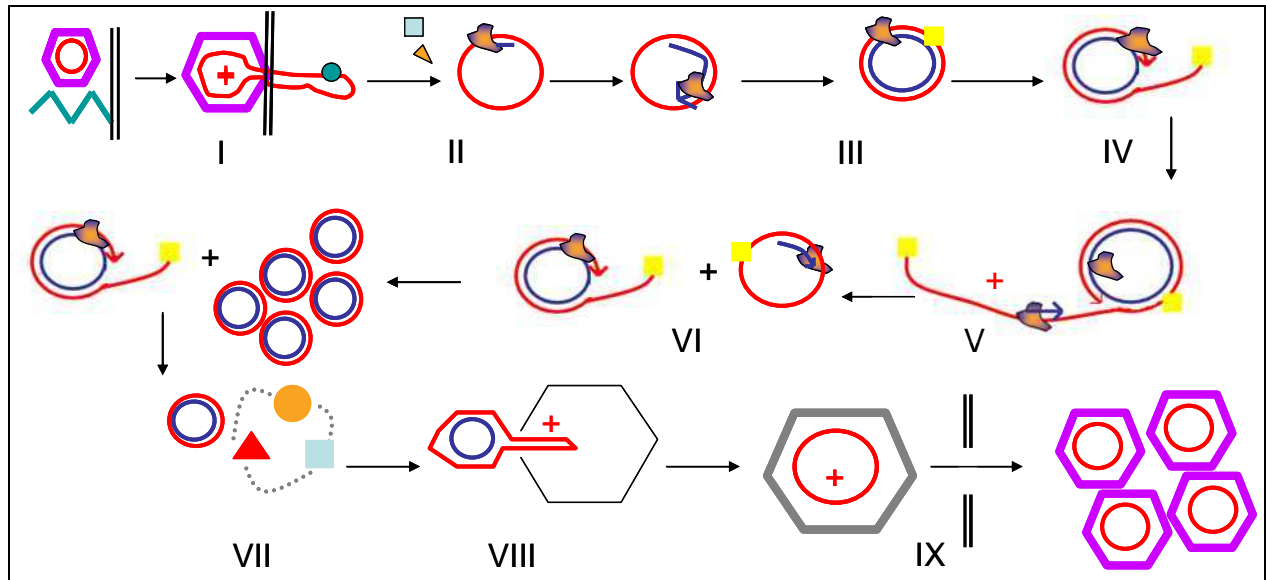


Figure 9 : Cycle de vie de PhiX174.

- I Reconnaissance du LPS de l'hôte, entrée de l'ADN viral, et accrochage de la protéine simple brin (Single Strand Binding Protein SSBP)
- II Constitution du primosome, et démarrage de la synthèse du brin (-)
- III Accrochage de la protéine A sur l'ADNdb, qui coupe du brin (+)
- IV Elongation du brin (+) à partir de l'extrémité 3'-OH, et déroulement du brin : réplication en « cercle tournant »
- V Accrochage du primosome sur le brin (+), et démarrage de la synthèse du brin (-)
- VI Ligation du brin (+) néoformé, pendant que la réplication en « cercle tournant » continue
- VII Constitution de la procapside
- VIII Insertion du brin (+) dans la procapside
- IX Sortie des provirions par lyse et maturation

i. *Adsorption*

PhiX174 diffuse passivement dans le milieu, et reconnaît le LPS de son hôte grâce à ses protéines de capsid G et H. Il injecte ensuite son ADN simple brin positif, grâce à des protéines virales (H) et bactériennes. L'ADN entrant simple brin est entouré par la protéine SSBP (Single Strain Binding Protein) de l'hôte qui le protège de la dégradation (Figure 9 - Etape I).

ii. Assemblage du préprimosome

Se réunissent ensuite les protéines d'un complexe préprimosome sur l'ADN. Ce préprimosome est composé de 13 protéines de l'hôte dont les suivantes : PriA, PriB, PriC, DnaT, et DnaB. L'ajout de DnaG rend le complexe fonctionnel. La bactérie synthétise alors le brin complémentaire négatif de l'ADN viral (Figure 9 - Etape II). Le brin négatif est transcrit et traduit en protéines. La protéine virale A* pourrait avoir un rôle dans l'inhibition de la réplication de l'ADN hôte(51).

iii. Réplication en « cercle tournant »

La protéine A de PhiX174, associée aux protéines de l'hôte (dont Rep), permet la réplication de 10 à 50 copies du génome double brin (Replicative Form, RF) dont le brin négatif sert de matrice pour la multiplication des génomes viraux, selon un processus de réplication de l'ADN « en cercle tournant » (Figure 9 - Etapes III à VI). La protéine Rep déroule la double hélice d'ADN, et la SSB stabilise les brins séparés.

iv. Assemblage des procapsides

Quand il y a un nombre suffisant de protéines structurales traduites, les protéines de capsides s'assemblent, aidées par les protéines d'échafaudages B et D, pour former une « procapside ». La protéine virale C aide alors à l'accrochage des RF néosynthétisées sur la procapside. J et les brins (+) rentrent dans les procapsides, et B en sort (Figure 9 - Etapes VII et VIII).

v. Lyse bactérienne

E est la protéine qui induit la lyse de la bactérie. Le mécanisme de la lyse reste sujet à controverses : tous s'accordent pour dire qu'E interfère avec des enzymes de l'hôte participant à la biosynthèse du peptidoglycane (ex. SlyD) et que la lyse a lieu une fois que le signal pour la division cellulaire a été lancé. Toutefois, Young et coll. pensent que la protéine E empêche la division cellulaire et que la cellule se déchire pour libérer les provirions (51). Alors que Lubitz et coll. pensent que la protéine E participe à la formation d'un tunnel entre la membrane interne et la membrane externe de la bactérie, et que les virus s'échappent par ce trou ; la bactérie se vidant de son contenu cytoplasmique par la même occasion (126). Quand les provirions sortent de la cellule, D s'en décroche et la capside se condense pour plus de

stabilité (Figure 9 - Etape IX). Seule la protéine K a un rôle mal connu, elle semble non-essentielle à la réussite de l'infection. Toutefois son expression permettrait d'augmenter le nombre de virions produits.

g. Expression des gènes de PhiX174

C'est le brin négatif néo-formé qui est transcrit en ARN (qui a donc la même séquence que le brin positif). Il n'y a que trois promoteurs sur le génome de PhiX174, placés chacun devant les gènes suivants : *A*, *B*, et *D*. Les ARNm s'arrêtent à l'un des quatre terminateurs localisés dans les régions intergéniques *J/F*, *F/G*, *G/H*, et *H/A*. Ces brins d'ARNm plus ou moins longs permettent une régulation du nombre de copies des protéines plus ou moins nécessaires en nombre pour l'assemblage de la capsid (la protéine D serait la plus abondante - 240 copies, G et F – 60 copies de chacune, et H – 12 copies). Une fois l'ARNm transcrit, chaque gène à son propre codon d'initiation pour la traduction et son propre codon stop. Il est intéressant de noter que le gène *E*, qui est pourtant superposé au gène *D*, encodant la protéine majoritaire, est lui faiblement traduit, et ce sans doute à cause de la faiblesse du site d'accrochage du ribosome. Bien que l'on ne considère pas que les petits virus comme PhiX174 aient une étape précoce et une tardive pour leur transcription, on note que l'organisation même du génome leur permet de réguler la traduction des différents gènes.

h. Mutations de résistance à PhiX174 chez E. coli

Plusieurs mutations chez *E. coli* lui confèrent un phénotype de résistance à PhiX174. Nous l'avons vu précédemment, certaines mutations sur les gènes participant à la biosynthèse du LPS d'*E. coli* confèrent à la bactérie une résistance partielle ou totale.

Par ailleurs, l'inactivation par mutation ou la délétion du gène *rep*, encodant une hélicase participant à la réplication de l'ADN viral, confère une résistance dite « absolue » à *E. coli*. Jusqu'à présent aucun mutant de PhiX174 esquivant cette résistance n'a été observé. Certaines mutations ponctuelles du gène *rep* (mutants *gro87* et *gro89*) sont toutefois contournables par PhiX174 (mutant *ogr(rep)*) (47).

Enfin, la mutation du gène *slyD* permet à l'hôte de résister à la lyse induite par la protéine E. Des mutants de PhiX174 contournant cette résistance ont été observés (mutants Epos) et semblent même plus virulents que le virus sauvage sur l'hôte ancestral (17). Des bactéries résistant à ces mutants Epos ont à leur tour été isolées, avec des mutations localisées

au niveau du gène *mraY* (17). Il a été suggéré que SlyD permette la stabilisation de la protéine E qui s'accumulerait et bloquerait MraY (16).

L'étude de ces mutants bactériens résistants et des mutants viraux contournant ces résistances est intéressante, puisqu'elle permet de pointer du doigt les protéines hôtes et parasites qui interagissent. Si nous avons choisi d'étudier la coévolution antagoniste avec ce système *E. coli* / PhiX174, c'est que les mutations de résistance ne sont pas uniquement des mutations modifiant le récepteur à PhiX174, mais qu'il en existe aussi qui bloquent l'infection au moment de la réplication, ou de la lyse. Cela laisse penser que la coévolution antagoniste entre *E. coli* et PhiX174 peut être différente de celle entre *E. coli* et les bactériophages T où seules des mutations du récepteur ont été observées.

3. Expérimentations avec le système *E. coli* – PhiX174

L'évolution des *Microviridae* a été étudiée en plaçant notamment PhiX174 sous différentes pressions de sélection (hautes températures, alternance d'hôtes, modification du récepteur de l'hôte) en le laissant se multiplier sur un certain nombre de générations, avant de le séquencer. L'émergence et la disparition des mutations avantageuses (ou compensatoires) a ainsi pu être observée (94).

Les mutations d'adaptation les plus couramment observées sont localisées sur les gènes de capsides, elles permettent d'augmenter le taux d'adsorption, et l'efficacité de la pénétration de l'ADN viral. D'autres mutations ont été observées : sur le gène A pour optimiser sans doute son interaction avec la protéine Rep, ou affectant la morphogénèse et/ou la stabilité de la capside à haute température. De plus, l'utilisation préférentielle des codons les plus employés par l'hôte peut modifier la quantité relative des protéines traduites. Enfin, la structure secondaire du génome aurait toute son importance, puisque son repliement et les torsions qu'elle peut induire sur la capside modifieraient la capacité d'adsorption du virus.

L'évolution à long terme des *Microviridae* est limitée par leur incapacité à acquérir de nouvelles séquences par transfert horizontal.

V. Conclusion

Bactéries et virus ont tout d'abord surpris par leur capacité à générer des pathologies graves, et ce malgré leur toute petite taille qui les rend invisibles à l'œil nu. Aujourd'hui, si on reconnaît leur importance numérique et leur place au sein des écosystèmes, il n'en reste pas moins que les mécanismes et dynamiques d'interaction entre ces « simples » organismes, bactéries et bactériophages, doivent encore être étudiés, dans la nature et au laboratoire pour prévoir et maîtriser leur évolution.

Nous l'avons vu, des modèles théoriques et expérimentaux existent. Ils ont permis de préciser les principaux paramètres écologiques et phénotypiques agissant sur le cours de la coévolution antagoniste entre bactéries et bactériophages. En misant sur les connaissances accumulées sur *E. coli* et PhiX174 nous proposons de discuter, à présent, les contraintes génétiques limitant et dirigeant leur interaction.

EXPERIMENTATION ET RESULTATS

L'ambitieux objectif de mon travail de thèse était de relier les paramètres écologiques, phénotypiques et génétiques influençant la dynamique de coévolution antagoniste entre *E. coli* et PhiX174. Cependant, j'ai rencontré certaines difficultés qui m'ont poussé à étudier plutôt les contraintes génétiques limitant la coévolution bactérie – bactériophage et à chercher des conditions optimales pour l'étude de la coévolution.

Le premier obstacle auquel j'ai été confronté était la « contamination » de la souche ancestrale *E. coli* C du laboratoire par un prophage (cf. phage lambdoïde p.19). Cela m'a incité à réfléchir à ce qui faisait la spécificité des souches reconnues par PhiX174, et s'il était possible d'obtenir une souche sensible, séquencée et sans prophage, qui me permette de lancer sereinement les expérimentations de coévolution avec PhiX174.

Une fois cette souche « idéale » trouvée, j'ai constaté que la coexistence bactérie-bactériophage était très (trop) courte, ce qui compromettait l'étude de la coévolution. Ce deuxième obstacle m'a poussé à comparer la durée de coexistence bactérie – bactériophage entre différents mutants bactériens, afin de choisir un hôte qui perdure le plus longtemps possible avec PhiX174.

Une fois l'hôte choisi, j'ai lancé un protocole de coévolution entre *E. coli* et PhiX174, et j'ai comparé le taux d'évolution des virus en coévolution continue avec *E. coli* à celui des virus qui étaient confrontés chaque jour aux mêmes bactéries naïves et sensibles.

Vous retrouverez ces trois parties de mon travail de thèse ci-après. Dans un premier temps nous discuterons de la niche écologique de PhiX174. Puis nous considérerons l'influence du génotype de l'hôte sur la durée de coexistence bactérie – bactériophage et enfin, nous étudierons la coévolution entre *E. coli* et PhiX174.

I. Ecologie de la sensibilité à PhiX174

1. Introduction

Pour qu'il y ait coévolution antagoniste entre une bactérie et un phage, il faut avant toute chose que les deux protagonistes se rencontrent et que la bactérie soit sensible au phage. La première contrainte restreignant la coévolution est donc la délimitation de la « niche » écologique du phage, c'est à dire l'ensemble des hôtes qu'il peut (ou pourrait) infecter.

Nous l'avons vu, les hôtes naturels des virus du genre *Microvirus* sont les *Enterobacteriaceae* (66). Or en 1974, Susuki et coll., ont montré que la réplication de l'ADN de PhiX174 pouvait se faire chez des hôtes éloignés des *Enterobacteriaceae* comme *P. aeruginosa* (111). C'est donc que la niche de PhiX174 est limitée par sa possibilité de reconnaître le(s) récepteurs de l'hôte et de s'adsorber à sa surface. Nous avons cherché les déterminants génétiques bactériens de cette niche.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous sous la forme de l'article « soumis » au journal **Applied and Environmental Microbiology** depuis le 9 Novembre 2009.

2. Article « Bacteriophage PhiX174's ecological niche and the flexibility of its *Escherichia coli* lipopolysaccharide receptor »

Bacteriophage PhiX174's ecological niche and the flexibility of its *Escherichia coli* lipopolysaccharide receptor

Alix Michel, Olivier Clermont, Erick Denamur and Olivier Tenaillon*

INSERM U722 and Université Paris 7, Faculté de Médecine, site Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France,

* Corresponding author. Mailing address: INSERM U722 and Université Paris 7, Faculté de Médecine, site Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. Phone: 33 (0)1 57 27 77 45. Fax: 33 (0)1 57 27 77 24. E-mail: olivier.tenaillon@inserm.fr

Abstract

To determine bacteriophage PhiX174's ecological niche, 783 *Escherichia coli* natural isolates were screened for susceptibility. Sensitive strains are diverse regarding their phylogeny, and core-lipopolysaccharide (LPS), but all have rough phenotypes. Analysis of *E. coli* K-12 LPS mutants revealed that PhiX174's susceptibility occurs through a phenotypic convergence with diverse molecular defects.

PhiX174 belongs to the *Microviridae* family of bacteriophages. It is a small icosahedral non-tailed virus having a circular single-stranded DNA. From its isolation, in 1935, to nowadays, PhiX174 has been used in many landmark experiments because of its small genome size (5386 nucleotides), and non-pathogenic status. Furthermore, since PhiX174 is a coliphage, it can be used as an indicator of viral or fecal contaminations in aquatic environments (International Organization for Standardization - ISO 10705-2) (23).

In 1974, Suzuki et al. found that, while the phage infection is restricted to bacteria having a specific receptors, the replication of PhiX174 DNA can be supported by different *Escherichia coli* strains, and distantly related bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* (111). It implies that the limiting step for PhiX174 infection is the entrance and not replication nor lysis. The PhiX174's host commonly used is the laboratory derived strain *E. coli* C, which has a specific rough lipopolysaccharide (LPS) recognized as the receptor (52).

The LPS is a major component of the outer membrane of enterobacteria, essential for its stability, and interaction with the outer world. It is composed of a lipid A anchored in the membrane, an oligosaccharide core, and can have a polysaccharide (O-antigen) bound to this core. The inner part of the core LPS is highly conserved within the Gram negative bacteria (10), whereas the outer core biochemical structure of the LPS is more diverse. In the *E. coli* species five outer core types have been described: R1, R2, R3, R4 and K-12 (10). *E. coli* C exhibits an R1 core-type. The study of its recently published sequence reveals that its core LPS is fully functional but that the O-antigen is affected by an IS insertion in the *rfb* locus that generates its rough phenotype (GenBank accession number: CP000946). Interestingly a similar IS insertion is found in K-12 (20), making it also rough but nevertheless not sensitive to PhiX174, which suggest that exposed R1 core might be critical for PhiX174 infection. Among the ECOR collection, which is representative of the genetic diversity of the entire *E. coli* species (10, 89), there are up to 70% of R1 type (10),. However only 3% (8/291) of *E.*

coli strains isolated from sewage, stools, drinking water or laboratory have been found sensitive to PhiX174 (88).

To better define the molecular determinants affecting the ecological niche of the model virus PhiX174, (i) we screened a large collection of natural *E. coli* isolates for PhiX174 susceptibility, (ii) we characterised the identified sensitive strains based on their phylogenetic group, serotype and LPS core-type, (iii) we studied the susceptibility to PhiX174 of LPS mutants of *E. coli* K-12. Our analysis revealed that PhiX174 sensitivity is a phenotypic convergence with diverse molecular bases.

A restricted niche for PhiX174 among natural *E. coli* isolates

A collection of 783 natural *E. coli* isolates was screened for PhiX174 susceptibility: (i) 72 ECOR strains, encompassing commensal and pathogenic strains, human and animal hosts, and from different countries (89); (ii) 372 human commensal strains, from healthy volunteers in France (186), Colombia (28), Benin (46), Croatia (57), and Mali (55) (45, 48); (iii) 339 strains isolated from stools of French wild or domestic animals (49). Droplets of natural isolate overnight cultures were laid on top agar loaded with 10^7 PFU/mL PhiX174 (DSMZ4497) and incubated at 33°C as in (106). The bacteria were determined sensitive to PhiX174 when they didn't grow on a net opaque round. We checked the sensitivity of those bacteria that didn't grow, or which formed an irregular round, with droplets of PhiX174 stock solution on a layer of the bacterial culture (88).

Only six *E. coli* strains, or 0.8%, were found to be sensitive to PhiX174 (Table 1). This result is consistent with previous studies (88). Those strains are from all over the world (France, Mali, and Croatia). However, it appears that they are all commensal from human origin (Fisher exact test $p=0.04$). This observation might be interesting as human *E. coli* strains have few specificities (37, 49) and it might underly some human specific selective pressure.

To further investigate the requirement for sensitivity to PhiX174, we then looked for genotypic or phenotypic traits that would explain their common sensitivity.

Diversity of the natural *E. coli* isolates sensitive to PhiX174

O-types of the sensitive strains were obtained with O antisera agglutination (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) and all appeared to autoagglutinate (Table 1), confirming that the PhiX174 sensitive strains are rough, with no O-antigen bound to their core LPS.

The phylogenetic group and subgroups were assigned to the sensitive *E. coli* strains using the triplex PCR phylotyping method (36, 48). They belong to the A₁, A₀, B₁ and B₂₃ group/subgroups (Table 1). The reference PhiX174 sensitive *E. coli* C (DSM13127) strain belongs to the A₀ subgroup. It implies that sensitive strains are not monophyletic and that PhiX174 sensitive O-rough phenotype appeared independently several times. This further supports our hypothesis that entrance is the limiting step in PhiX174 propagation, and it implies that sensitivity to PhiX174 could occur through molecular convergence. Given that O-rough strains have the core of their LPS exposed, we looked whether the sensitive strains share a common core LPS.

Diversity of the core LPS structure of the natural *E. coli* isolates sensitive to PhiX174

Many enzymes participate to the synthesis of the LPS. The genes encoding the biosynthesis of the core LPS are mainly in the *waa* (or *rfa*) locus, organised into three operons *gmhD*, *waaQ*, and *waaA* (112), with three more genes *rfaE*, *lpcA*, *gmbB* distributed further on the genome. Five outer core LPS types of *E. coli* have been described (R1, R2, R3, R4 and K-12); they correspond to different compositions and sequences of the *waaQ* operon. A PCR method, with primers from the *rfa* locus, was used to differentiate the five LPS core-types (10). The natural *E. coli* isolates sensitive to PhiX174, were found to have an R1, R2 or even R3 LPS core-type LPS (Table 1). For the VDG401 strain both the R1 and R2 PCR were positive. This could correspond to an undescribed LPS core-type.

Once more, those sensitive strains are remarkable for their diversity. Since it appears that they have different *rfa* operons, different mutations could explain their common rough phenotype, and thus their sensitivity to PhiX174. To confirm it, we studied the impact of the knock outs of different genes involved in the core LPS synthesis of the model bacteria *E. coli* K-12 on its susceptibility to PhiX174.

Susceptibility to PhiX174 of *E. coli* K-12 core LPS mutants

E. coli K-12 exhibits a K-12 LPS core-type, has a rough phenotype, and is resistant to PhiX174. The susceptibility to PhiX174 of the single gene knock-out mutants *rfaB*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *L*, *P*, *Q*, *S*, *T*, *Y*, *Z*, *gmhB* and *lpcA* was tested using the KEIO collection (114). They were all resistant to lysis by PhiX174, except for *rfaB*, *rfaC*, *rfaD*, *rfaE*, *gmhB* and *lpcA*. According to literature, the deletions of *rfaC*, *rfaE*, *lpcA* confer a “deep rough” phenotype to the bacteria, preventing the hanging of the first heptose of the inner core LPS (14). As well, the enzyme GmhB participates in the biosynthesis of the first heptose. Nevertheless its activity could be partially complemented by another enzyme (74). The deletion of *rfaD* generates an heterogeneous LPS either heptoseless or with an incorrect form of the heptose (103). The *rfaB* mutation modifies the outer core. Since the inner core is highly conserved in the *E. coli* species, and not the outer core, we focused on the “deep rough” mutations.

It is interesting to note, that thanks to these *E. coli* K-12 sensitive mutants, the bacteria / bacteriophage interactions between *E. coli* and PhiX174 can now be studied in great depth with the enormous amount of knowledge accumulated on *E. coli* K-12.

Flexibility of the LPS of sensitive strains to PhiX174

Complementation of the *rfaC*, *rfaE*, *gmhB* and *lpcA* *E. coli* K-12 gene knock outs with their respective ASKA plasmids (73), and induced by isopropyl-beta-thio-galactoside (final concentration of 0.1μM), restored the resistance. However, when electroporated and induced in the natural *E. coli* isolates sensitive to PhiX174, none turned out to be resistant to PhiX174. It implies that their susceptibility can't be explained by a single deleterious mutation in one of these genes. Furthermore, it suggests that mutations in the more diverse parts of the core LPS might be additionally responsible for PhiX174 susceptibility. Thus, the susceptibility to PhiX174 can be sustained by a large range of different molecular defects affecting the LPS, either in *E. coli* K-12 or in *E. coli* natural isolates.

This flexibility in the recognition by PhiX174 has already been described. Different mutations on sensitive O-rough R1 type LPS strains (derived from *E. coli* C) had different impacts in its recognition by PhiX174. For instance the deletion of the terminal galactose turns the bacteria resistant (52), whereas the deletion of the terminal glucose (*rfaV*) doesn't, but this latter deletion decreases its sensitivity (52, 95). Similarly, the deletion of the third heptose of the

inner core of O-rough R1 LPS (*rfaQ*) doesn't affect the sensitivity to PhiX174 (94). Thus the outer core of O-rough R1 LPS can tolerate a few mutations without turning the bacteria resistant. Besides, *Salmonella typhimurium* can be sensitive to PhiX174 despite its non-R1 core LPS, that bears different hexoses and branching (69). From all those observations, it has been suggested that PhiX174 recognition and adsorption process is dependent on the global conformation of the LPS rather than on its precise composition (52). The recognition of potential hosts by PhiX174 has hence some flexibility. Here, we show that this flexibility is even larger number as we show that R2 or R3 core LPS type, and “deep-rough” *E. coli* K-12 mutants can also be sensitive to PhiX174, and thus the core LPS can be either complete, modified or even totally truncated.

Evolutionary implications

Considering that some *E. coli* K-12 “deep-rough” strains are sensitive to PhiX174, we suggest here that those “deep-rough” strains are highly disadvantaged. Indeed, they are characterized *in vitro* by a reduced growth rate, an hypersensitivity to detergents and hydrophobic antibiotics and are sensitive to some rough specific phages (1, 8). Moreover, they are affected in the way they move (67), in their ability to conjugate (105, 107), and they have an attenuate virulence phenotype (2). All those drawbacks make “deep-rough” strains counter selected in the long term and therefore rare. The genetic variability we observed in the sensitive natural isolates further comfort the idea that sensitivity to PhiX174 emerges *de novo* by a molecular defect and is counter selected in the long run. Indeed, there is no substantial monophylogenetic group of natural O-rough *E. coli* isolates that would support a fair long-term fitness for such a phenotype. The presumably low long-term fitness of those strains suggests that the niche of PhiX174 is made of strains having recently lost there LPS integrity, having both variable genetic backgrounds and variable LPS structures. This compels PhiX174 to face a very large diversity of host type in the wild. This could partly explain why most adaptation of the phage observed on laboratory strains was associated with adsorption (94) as wild type PhiX174 have presumably to be generalist.

The authors want to thank the “National BioResource Project (NIG, Japan)” for the KEIO collection, and for the ASKA plasmids used in this study. A. M. was supported by a fellowship from the French Research Ministry. E. D. was partially supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale”. O. T. was supported by the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-05-JCJC-0136-0).

Table 1: Characterization of the *E. coli* sensitive strains to PhiX174

Strains	Country	Host	<i>E. coli</i> group/subgroup ¹	O - type ²	LPS core type ³
<i>E. coli</i> C (DSMZ13127)	France	Sewage	A ₀	Autoagglutinating	R1
M1402	Mali	Human	B1	Autoagglutinating	R3
C4741	Croatia	Human	A ₀	Autoagglutinating	R1
VDG388	France	Human	A ₁	Autoagglutinating	R2
VDG401	France	Human	A ₁	Autoagglutinating	R1 and R2
ROAR340	France	Human	B2 ₃	Autoagglutinating	R1
ROAR375	France	Human	A ₁	Autoagglutinating	R2

¹ *E. coli* phylogenetic group and subgroups were determined as in (36, 48).

² O-type were determined by O-antisera autoagglutination.

³ LPS core type were determined by PCR amplification as in (10).

3. Commentaires de l'article : résultats et discussion

a. Sensibilité à PhiX174 des isolats naturels d'E. coli

Nous avons étudié la sensibilité à PhiX174 de 783 isolats naturels d'*E. coli*, commensaux ou pathogènes, isolés à partir d'hôtes humains ou animaux, provenant de différents pays. De part leur diversité, ces souches sont représentatives de l'espèce *E. coli*.

Nous avons déposé des gouttes de chaque culture bactérienne sur un tapis du virus. Nous avons considéré que les bactéries qui ne poussaient pas en formant un rond opaque et net, étaient sensibles au virus. Nous avons vérifié cela en faisant l'inverse, c'est à dire une goutte de solution stock de virus sur le tapis bactérien. Au final nous avons trouvé seulement 6 souches sensibles à PhiX174, soit 0,8%.

Nous avons recherché le trait phénotypique expliquant la convergence (sensibilité à PhiX174) entre ces 6 isolats naturels et la souche *E. coli* C de référence (DSMZ13127). Nous avons déterminé le groupe et sous-groupe phylogénétique par PCR triplex (36, 48), l'antigène O par agglutination avec des anticorps (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark), et la structure du noyau du LPS par PCR spécifique de la région *rfa*, et ce pour chacune de ces souches sensibles à PhiX174 (10). Nous avons trouvé que les souches étaient remarquables par leur diversité (Table 1, p 64). Elles sont polyphylétiques puisqu'elles se répartissent dans les groupes et sous-groupes A₁, A₀, B1 et B2₃, et appartiennent à des groupes de noyau du LPS différents R1, R2 et R3. Toutefois elles partagent un trait phénotypique : elles sont toutes les 7 des souches « rough », c'est à dire sans antigène O. Les 6 isolats naturels sont aussi tous commensaux et d'origine humaine.

Puisque nous avons trouvé que la ressemblance entre les souches sensibles à PhiX174 tenait à l'absence d'antigène O sur leur LPS, alors que la structure du noyau de leur LPS pouvait être propre à chacune, nous nous sommes demandé si une unique mutation au niveau des gènes communs à tous les noyaux pouvait expliquer leur sensibilité ou bien si différentes mutations étaient possibles. Pour répondre à cette question, nous avons étudié la sensibilité des souches d'*E. coli* K-12 mutées au niveau des gènes codant la biosynthèse du LPS. Il est intéressant de noter ici qu'*E. coli* K-12 est une souche « rough », avec une séquence d'insertion (IS5) insérée dans l'opéron *rfb* bloquant ainsi la biosynthèse de l'antigène O (20), et qu'elle est résistante à PhiX174; alors qu'*E. coli* C est aussi « rough », avec une IS1 insérée dans le *rfb*, mais elle est sensible à PhiX174.

b. Sensibilité à PhiX174 des mutants d'E. coli K-12, modifiés au niveau du noyau du LPS

Nous avons testé la sensibilité des souches de la banque KEIO (suppression des gènes par insertion d'une cassette kanamycine dans le gène ciblé). Nous avons trouvé que les mutants *rfaE*, *rfaD*, *rfaC*, *lpcA* et *gmhB* étaient sensibles à PhiX174. Ces 5 mutants confèrent

tous un phénotype « deep-rough » à la bactérie, en empêchant la fixation du premier heptose sur le sucre KDO du LPS. De plus, nous avons trouvé que la délétion de *rfaB*, rendait aussi la souche sensible à PhiX174. Puisque le LPS de la souche de référence *E. coli* C, décrit en 1976 (52) est constitué d'un noyau de type R1 intact et que nous avons trouvé deux autres conformations de LPS « sensibles » à PhiX174, alors nous pouvons conclure que différents LPS peuvent être reconnus par PhiX174 (Figure 10).

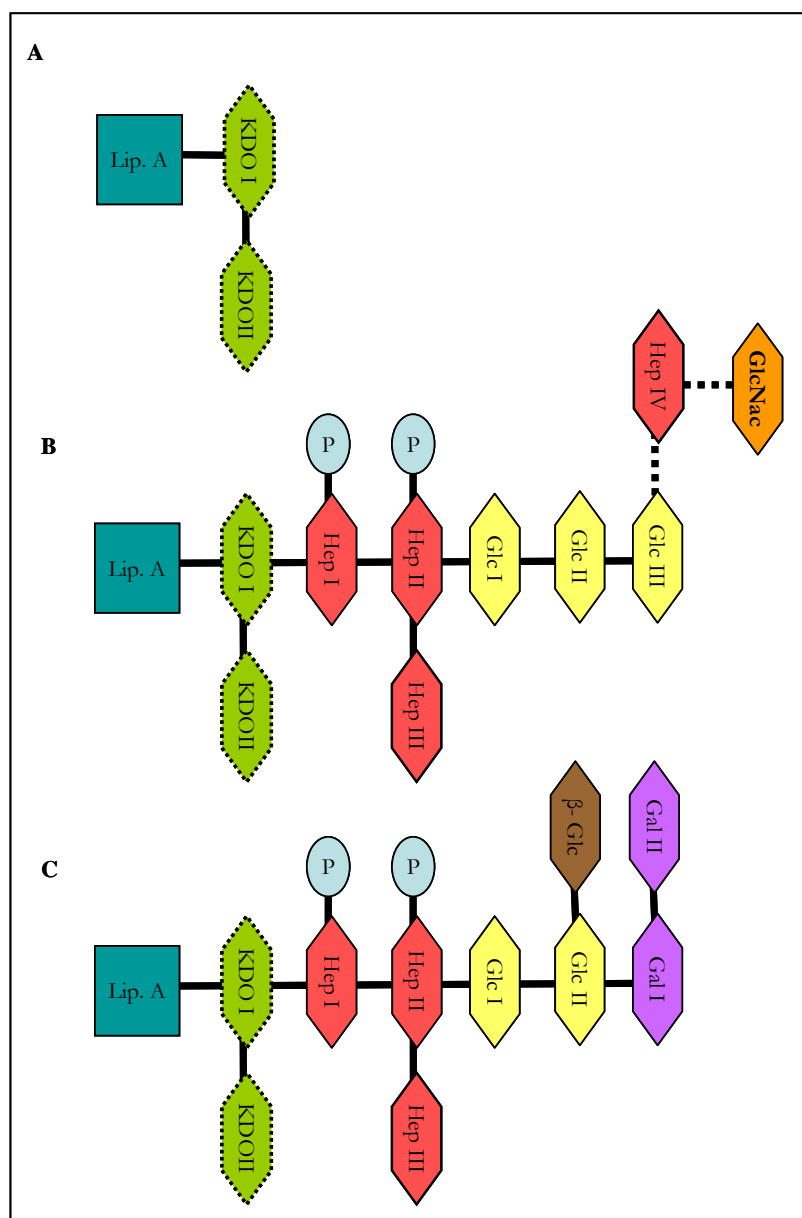


Figure 10 : Noyaux des LPS d'*E. coli* reconnus par PhiX174.

Lip.A : lipide A, Gal : galactose, Glc : glucose, β -Glc : β -glucoside, Glc-Nac : N-acetylglucosamine, P : phosphate, KDO : 2-keto-3-deoxyoctonate.

LPS des souches sensibles à PhiX174 : **A** : *E. coli* - $\Delta rfaC$, **B** : *E. coli* K-12 - $\Delta rfaB$, **C** : *E. coli* C.

c. Niche écologique de PhiX174

Différentes mutations pourraient, nous l'avons vu, conférer un phénotype sensible à PhiX174 aux souches d'*E. coli*. Or, les souches portant des mutations profondes les rendant « deep rough » sont fortement désavantagées. En effet, la stabilité de la membrane bactérienne est compromise, ce qui modifie la sensibilité des ces souches aux détergents et antibiotiques, leur motilité, capacité de conjuguer, et pathogénicité. Si nous considérons que ces LPS réduits au minimum sont reconnus par PhiX174 en tant que récepteurs, cela veut dire que la niche écologique de ce virus repose (du moins en partie) sur l'émergence d'un défaut moléculaire fortement délétère. Cela expliquerait que les souches sensibles soient peu fréquentes (0,8 %). Dans cette hypothèse le fait que la mutation délétère soit portée par un gène fortement conservé, et partagé par tous les types de noyaux de LPS, expliquerait que les souches sensibles soient polyphylétiques.

Toutefois, on peut faire l'hypothèse que PhiX174 ne reconnait pas uniquement un LPS très peu fonctionnel et rare ; et qu'il reconnait également le noyau intact d'*E. coli* C. PhiX174 aurait donc une reconnaissance relativement « large » des souches sensibles, depuis celles qui ont un noyau intact (mais d'un type donné (R1) correspondant à *E. coli* C), jusqu'à celles qui n'ont pas d'heptoses sur le noyau. Cette flexibilité au niveau de la reconnaissance lui permettrait de s'adapter ensuite à son hôte. La plupart des mutations d'adaptation ont d'ailleurs été observées au niveau des gènes de capside du bactériophage (*G*, *H*, *F*) (29, 39, 123).

4. Expérimentations complémentaires à l'article

Nous n'avons néanmoins pas établi la nature des mutations conférant la sensibilité à PhiX174 aux 6 isolats naturels que nous avons trouvés. Ces souches pourraient aussi bien être « rough » comme *E. coli* C, ou avec le noyau du LPS modifié comme *E. coli* K-12- $\Delta rfaB$, ou encore « deep-rough » comme *E. coli* K-12 $\Delta rfaC/D/E$, $\Delta lpcA$, et $\Delta gmhB$. Nous avons donc séquencé la région *rfa* de ces 6 souches (environ 15kb).

Nous avons amplifié par PCR « Long Range » la région *rfa* à partir de l'extraction de l'ADN génomique total des souches sensibles à PhiX174. Nous avons rassemblé les produits de PCR dans un même échantillon que nous avons adressé au Génoscope pour séquençage à l'aide d'un appareil de séquençage à haut débit Solexa. Les séquences de 36 pb obtenues ont

été alignées sur différents locus *rfa* récupérés sur Mage (*E. coli* IAI1, *E. coli* O157:H7, *E. coli* CFT073, *E. coli* K-12). Cela nous a permis de confirmer l'appartenance des souches aux différents groupes de noyaux de LPS, ce que nous avons déjà déterminé par PCR. Cependant nous n'avons pas pu étudier les séquences base par base, et nous ne pouvons donc pas conclure quant aux mutations qui expliqueraient le phénotype « rough » (ou « deep rough ») des souches. Nous n'avons pas identifié d'événements qui pourraient clairement être impliquées dans l'inactivation d'un gène : délétions, insertions, décalage du cadre de lecture, transpositions ou encore codon-stop. Cette étude est limitée car un grand nombre de mutations peuvent affecter un gène sans pour autant avoir une signature évidente.

5. Critique du protocole de screening des souches sensibles à PhiX174

Nous avons choisi de détecter les souches sensibles à PhiX174 en déposant des gouttes (5µL) des cultures bactériennes ($\sim 10^9$ cfu/mL) sur un tapis de virus ($\sim 10^7$ pfu/boîte), comme l'avaient fait Muniesa et coll. (88). Nous avons ainsi obtenu 6 souches sensibles à PhiX174. Nous aurions pu choisir le protocole inverse, plus classique, à savoir déposer des gouttes de solution de virus sur les tapis bactériens. Mais cette méthode est beaucoup plus longue, compte tenu du nombre d'isolats naturels à tester. Nous l'avons toutefois appliquée aux souches KEIO, puisqu'elles étaient moins nombreuses (15 au total). Nous avons été surpris d'obtenir plus de clones sensibles à PhiX174 qu'avec le protocole décrit dans l'article. En effet, en plus des mutants décrits dans l'article (*rfaC*, *rfaD*, *rfaE*, *rfaB*, *lpcA* et *gmhB*) 5 autres mutants (*rfaY*, *rfaJ*, *rfaF*, *rfaH*, *rfaI*) se sont révélés sensibles.

Nous pouvons considérer que plusieurs facteurs peuvent modifier le rapport de force entre bactéries et bactériophages, et expliquer cette différence de résultat. D'une part, avec le premier protocole (goutte de cultures bactériennes sur tapis de virus), nous devrions avoir localement un rapport entre le nombre de bactéries sur le nombre de phages plus important que dans le second protocole ; on peut donc supposer que la probabilité d'émergence de mutation d'élargissement du spectre d'hôte chez le phage soit donc plus importante avec le second protocole. D'autre part, et de façon plus pragmatique, nous pouvons considérer que le fait de déposer les cultures bactériennes à la surface du tapis plutôt que de les stabiliser dans la matrice d'agarose modifie leur interaction avec les phages. Enfin, le choc thermique, que nous faisons subir soit aux bactéries (qui résistent bien à 42°C) soit aux phages (qui sont plus fragiles) en les mélangeant à l'agarose chaud et liquide pour former le tapis, n'a sans doute pas le même impact sur la sensibilité des bactéries et l'infectivité des phages.

On peut donc supposer que nous aurions trouvé plus de souches sensibles à PhiX174 si nous avions appliqué le second protocole à notre collection de souches naturelles d'*E. coli*. Mais nous faisons l'hypothèse que le protocole choisi et décrit dans l'article, en étant plus sélectif, nous a permis de détecter les souches les plus sûrement sensibles. *In natura*, on peut supposer que les hôtes que nous avons trouvés avec le premier protocole sont ceux qui sont préférentiellement infectés. Cela appuie néanmoins l'idée présentée dans l'article, à savoir qu'un large éventail de structure de LPS peut être reconnu par PhiX174, et que cette souplesse au niveau du récepteur lui permet de palier à la rareté de ces souches de faible valeur sélective.

6. Conclusions

Cette première étude nous a permis de discuter de la délimitation de la niche écologique de PhiX174. Nous avons trouvé que la reconnaissance des souches d'*E. coli* sensibles par PhiX174 est relativement « souple ». Ainsi l'adsorption de PhiX174 serait finalement « peu » contrainte. Ceci implique de plus qu'*E. coli* ne peut pas résister à PhiX174 en réduisant au minimum son LPS, comme cela est possible face au bactériophage T7. Notons ici le fait que tous les isolats naturels d'*E. coli* sensibles à PhiX174 sont des souches commensales et d'origine humaine. Cela suggérerait-il que la pression de sélection dans le tube digestif humain favoriserait les souches « rough » ?

Par ce travail, nous avons aussi apporté des éléments qui donnent un éclairage nouveau sur le mécanisme de reconnaissance de l'hôte par PhiX174. Nous avons suggéré que PhiX174 ait la possibilité de reconnaître des structures de LPS très variables (LPS de type R1 entier, LPS de type K-12 modifié, ou LPS rogné au minimum). Nous vous proposons de considérer, à présent, le fait que seules les bactéries exposant le noyau de leur LPS intact (comme *E. coli* C ou éventuellement un peu modifié comme les mutants *E. coli* K-12- $\Delta rfaB$) seraient reconnues par PhiX174. Nous pourrions alors faire l'hypothèse que les mutations profondes du LPS, ne permettent pas la première phase d'adsorption par PhiX174, mais plutôt rendent accessible le second récepteur de PhiX174, celui dont parle Fane (51), et qui serait indispensable à la pénétration de l'ADN viral dans la cellule. On peut alors imaginer que le premier récepteur reconnu puisse être en partie modifié par les bactéries pour résister au phage. Nous n'avons d'ailleurs pas trouvé que toutes les modifications du noyau du LPS d'*E. coli* K-12 lui conféraient la sensibilité à PhiX174. C'est donc, qu'il faut que le LPS ait une

certainne conformation que toutes les mutations ne permettent pas. Cette idée est attirante, mais nous devons noter ici qu'aucune étude n'appuie l'hypothèse de ce second récepteur.

Enfin, cela nous a permis de trouver différents mutants d'*E. coli* K-12 (une souche bien connue, ne portant pas de lambdoïdes « ré-activables » et séquencée) sensibles à PhiX174. Ces mutants pourraient donc nous permettre de mettre en place des protocoles de coévolution, après nous être assuré qu'ils ne portaient pas de prophages.

II. Génotype bactérien et pérennité de la coévolution

1. Introduction

Après avoir cherché à définir les limites de la niche écologique de PhiX174 lors de notre première étude, nous nous sommes demandé quelles contraintes génétiques bactériennes limitaient encore la coévolution antagoniste entre *E. coli* et PhiX174. En effet, nous avons constaté que la coexistence entre *E. coli* K-12- $\Delta rfaC$ et PhiX174 était très courte ; au troisième jour du co-ensemencement, il n'y avait plus de bactéries, ni de virus.

Nous avons donc choisi d'étudier l'impact de différentes mutations bactériennes sur la durée de coexistence entre *E. coli* C et PhiX174, et de tester ainsi la longévité d'un système biologique en coévolution dans un environnement donné. En supprimant des gènes susceptibles d'intervenir dans l'interaction bactérie – bactériophage, nous avons modifié les possibilités d'adaptation des deux protagonistes. Les mutations choisies sur *E. coli* C touchent l'une des trois étapes de l'infection : l'adsorption, la réplication ou la lyse (Figure 11).

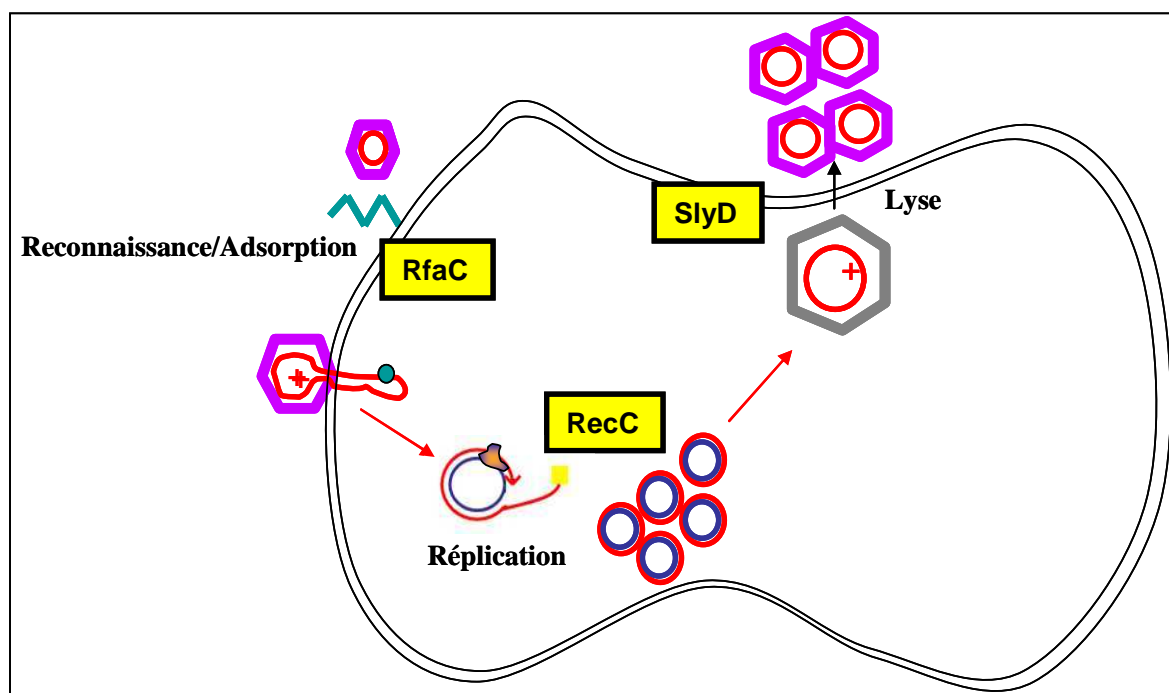


Figure 11 : Etapes de l'infection d' *E. coli* C par le phage PhiX174 perturbées par la suppression des gènes *rfaC*, *recC* et *slyD*.

Comme nous l'avons vu lors de la première étude, les mutants d'*E. coli* K-12 dont le gène *rfaC* a été supprimé, sont sensibles à PhiX174. Ils ont un LPS tronqué au niveau du premier heptose, c'est-à-dire uniquement constitué par le lipide A, et les deux KDO. En supprimant le gène *rfaC* de la souche *E. coli* C, nous contraignons donc fortement l'évolution de la bactérie. En effet, il est dit que les souches ne pouvant synthétiser les KDO ne sont pas viables, et ce même *in vitro* (74, 119). Elle ne peut donc pas modifier davantage son LPS.

Nous avons vu dans l'étude bibliographique que la délétion ou l'inactivation du gène *rep* confèrent un phénotype de résistance « absolue » à la bactérie, aucun virus contournant ces mutations n'ayant été décrit jusqu'à présent. Or le double mutant $\Delta rep\text{-}\Delta recC$ est synthétique létal (118). En supprimant le gène *recC* nous empêchons donc la résistance absolue *rep* d'émerger.

Enfin, nous avons choisi de travailler avec le mutant de résistance *slyD*. Des mutants de PhiX174 contournant cette mutation ont été décrits, ainsi que des mutants bactériens résistants à ces virus de deuxième génération (17). En conséquence, nous pensons isoler ces mutants bactériens et viraux.

Nous avons construit ces trois mutants ($\Delta rfaC$, $\Delta recC$, $\Delta slyD$) à partir de la souche d'*E. coli* C. Nous avonsensemencé chacun des mutants ainsi qu' *E. coli* C avec PhiX174, et nous avons fait des cycles de coévolution de 24h. Nous avons obtenu que la durée de la coexistence bactérie - bactériophage est très influencée par le génotype de l'hôteensemencé au premier jour. Nous n'avons pas observé d'effet du rapport initial entre les concentrations de bactéries et de virus (COI).

Les résultats obtenus ont été présentés sous la forme d'une communication affichée le 27 septembre 2009 à Roscoff, lors de la conférence Jacques Monod « **Maladies infectieuses émergentes : focus sur les nouvelles approches expérimentales et théoriques de l'évolution virale** » (reproduite à l'annexe p125).

2. Matériel et méthodes

a. Construction des mutants bactériens

A partir de la souche *E. coli* C (DSMZ13127) nous avons obtenu les mutants *E. coli* C $\Delta rfaC$, *E. coli* C $\Delta recC$, et *E. coli* C $\Delta slyD$ par méthode Wanner (41). Il s'agit de remplacer

un gène cible par une cassette de résistance à la kanamycine. Pour cela on procède en trois étapes.

(i) Préparation de la souche d' *E. coli* C réceptrice

On transfère le plasmide pKD46, porteur d'une recombinaise, à la souche sauvage *E. coli* C par électroporation. Ce plasmide comprend une résistance à l'ampicilline et il est thermosensible, c'est-à-dire qu'*E. coli* le porte à 33°C, mais elle le perd à 37°C. *E. coli* C estensemencée dans du milieu riche Luria Casein (LC), à partir d'une solution glycérolée et stockée à -80°C. Après une nuit d'incubation à 37°C, avec une agitation régulière, les bactéries sont mises en phase exponentielle : 1mL de bouillon de culture inoculé dans 50mL de LC, le tout mis à incuber pendant 3h à 37°C, avec agitation. Les bactéries sont ensuite lavées pour enlever tous les sels qui pourrait gêner l'électroporation, et pour rendre la membrane plus perméable. Les 50mL de culture bactérienne sont centrifugés 5 minutes à 8000 rpm (Revolutions Per Minute, ou tour par minute), le culot est re-suspendu dans 10mL de glycérol froid (solution de glycérol à 10% stérilisée et stockée à 4°C), et centrifugé 5 minutes à 8000 rpm. Ce lavage est reproduit 4 fois de suite. Enfin, les bactéries sont récupérées dans 200µL d'eau stérile, et conservées dans de la glace en attendant l'électroporation. 2µL de la solution d'extraction du plasmide pKD46 sont ajoutés à 50µL de cellules lavées, et l'électroporation se fait à 2500V (appareil Electroporator 2510 de marque Eppendorf). Les bactéries sont rapidement récupérées dans 1mL de LC, mises à incuber 1h à 33°C, puis 100µL sont étalés sur des boîtes de LCA (LC agar) complémentées avec de l'ampicilline (100µg/mL). Après une nuit d'incubation à 33°C, les clones ayant poussé sont à nouveau striés sur des boîtes avec ampicilline. Un clone issu de cette deuxième boîte estensemencé dans 10mL de LC complémenté avec de l'ampicilline (100µg/mL). Après une nuit d'incubation à 33°C, avec une agitation régulière, on ajoute 1mL de ce bouillon de culture à 1mL de glycérol 80%, on agite et on stocke la souche à -80°C.

(ii) Adressage de la cassette de résistance à la kanamycine

Pour que la recombinaison ait lieu au site précis du gène à supprimer, on borde par élongation PCR (Polymerase Chain Reaction) la cassette de résistance des séquences correspondant aux extrémités du gène cible. Nous avons choisi d'utiliser les souches de la banque KEIO qui portent déjà la cassette kanamycine à la place des gènes que nous voulons supprimer chez *E. coli* C. Nous avons choisi une amorce à 100 pb environ du codon

d'initiation, et une autre à 100 pb environ après le dernier codon. Nous avons fait une élongation par PCR par couple d'amorces en utilisant le kit Taq polymérase d'Invitrogen, et selon leurs conditions de mélange directement sur les lysats des souches KEIO ($\Delta rfaC$, $\Delta recC$, et $\Delta slyD$) (appareil Mastercycler gradient de marque Eppendorf, programme (1) dénaturation 5min à 95°C, (2) 30s à 95°C, (3) 30s à 60°C pour l'accrochage des amorces, (4) 30s à 72°C pour l'élongation, (5) retour à l'étape (2) pour 29 cycles, (6) 72°C, 5min, et enfin (7) 10°C). Nous avons vérifié la taille du produit attendu par migration sur gel d'agarose 1%. Les produits de PCR ont été purifiés par dialyse sur des membranes (10µL déposés sur la membrane elle-même à la surface de l'eau, pendant 20 min) (Membrane filters de marque Millipore, 0.05µm).

(iii) **Recombinaison et sélection des mutants d'*E. coli* C**

La souche réceptrice (*E. coli* C + pKD46) est ensemencée dans du milieu LC, complémenté en ampicilline (100µg/mL). Après une nuit d'incubation à 33°C, avec agitation régulière, on met les bactéries en phase exponentielle (cf. ci-dessus), en ajoutant de l'arabinose (0,02% final) pour induire la production de recombinaison. Les bactéries sont lavées (cf. ci-dessus) et chaque produit de PCR est électroporé dans la souche réceptrice (cf. ci-dessus). Les bactéries sont reprises dans 1mL de LC, et mises à incuber à 33°C pour 1h, avant d'étaler 100µL sur des boîtes de LCA complémentées avec de la kanamycine (30µg/mL). Après une nuit d'incubation à 37°C, les clones ayant poussé sont à nouveau striés sur des boîtes avec kanamycine. Un clone pour chaque mutant, issu de ces deuxièmes boîtes, est ensemencé dans 10mL de LC complémenté avec de la kanamycine (30µg/mL). Après une nuit d'incubation à 37°C, avec une agitation régulière, on ajoute 1mL de ces bouillons de culture à 1mL de glycérol 80%, on agite et on stocke les souches à -80°C.

Nous avons vérifié tous les mutants obtenus par élongation PCR avec des amorces choisies de part et d'autre des gènes supprimés ainsi que dans la cassette de résistance.

b. Conditions de l'expérimentation

Nous avons observé à l'occasion de mon master 2 que la coexistence était plus longue en diluant le milieu de culture ; c'est pourquoi nous avons choisi de faire coévoluer bactéries et virus dans du milieu LC dilué au quart avec du MgSO₄ (10⁻²M). Ce milieu a été complémenté par une solution de sels (dilution au millièème d'une solution mère d'Infective

Juice IJ, [CaCl₂ (0,5M), MgCl₂(1M)]) pour permettre l'adsorption des virus aux bactéries (cf. p-49).

Nous avons confrontés les 4 géotypes bactériens (*E. coli* C, *E. coli* C- Δ slyD, *E. coli* C- Δ rfaC, *E. coli* C - Δ recC) au virus PhiX174 (DSMZ4497) avec trois COI différents (10^{-1} , 10^{-4} et 10^{-6}). Chaque condition a été reproduite en 6 réplicats, soit 72 populations en parallèle. Les bactéries ont étéensemencées à partir des cultures de une nuit lancées avec les solutions glycérolées et stockées à -80°C (10 μ L d'une solution à environ 5.10^9 unités ou CFU/mL), et les bactériophages ont étéensemencés à partir de la solution amplifiée sur *E. coli* C et stockée à 4°C (10 μ L d'une solution à 5.10^8 , 5.10^5 , 5.10^3 unités ou PFU/mL), dans 10mL de milieu (tubes de 50mL). Les tubes ont été incubés à 33°C, avec une agitation continue (130 rpm).

Tous les jours, à la même heure, et ce jusqu'au neuvième jour, 10 μ L de chaque population ont été transférés dans des milieux frais, et remis à incuber avec agitation.

c. Suivi de la coexistence bactérie - bactériophage

Quotidiennement, juste avant le transfert, nous avons noté la présence des bactéries en mesurant la densité optique (DO) à 600nm. Nous avons considéré qu'il y avait des bactéries dans le milieu quand la DO était supérieure à 0,01.

De même, nous avons noté la présence des virus en testant l'infectivité du bouillon de culture sur un tapis de l'hôte ancestral. Pour cela nous avons versé 3mL de milieu LCA (LC complété de 7.5g d'agar/L) enrichi en IJ et maintenu à l'état liquide à 42°C, dans lequel nous avons ajouté 300 μ L d'un bouillon de culture d'*E. coli* C. Une fois le tapis bactérien coulé et séché à proximité de la flamme, nous avons déposé des gouttes (5 μ L) des différentes populations en coévolution. Nous avons considéré qu'il y avait encore des virus dans le milieu quand nous observions de la lyse au niveau du dépôt, après avoir incubé les boîtes de Pétri à 33°C pour une nuit.

3. Résultats et Discussion

a. Durée de coexistence et géotype de l'hôte

Nous avons observé que la durée maximale de coexistence bactérie – bactériophage était très variable d'un géotype bactérien à l'autre (Figure 12).

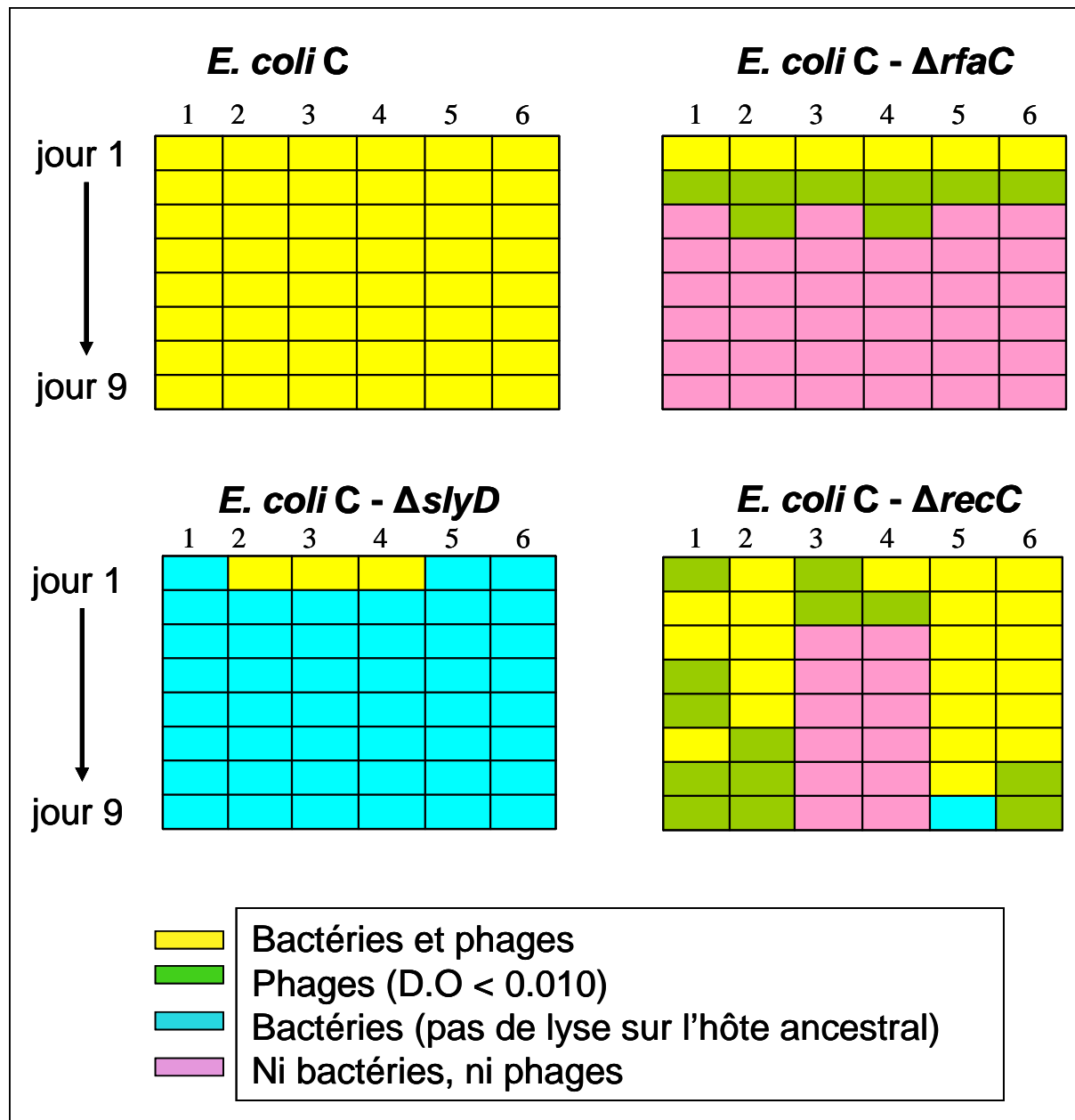


Figure 12 : Pérennité de la coexistence bactérie – bactériophage.

Les différents réplicats sont distribués en colonne (1 à 6), seuls les résultats pour le COI initial de 10^{-4} sont ici représentés.

Le temps s'écoule de haut en bas, comme indiqué par la flèche.

Code couleur : En **jaune**, bactéries et virus sont présents dans la population ; en **vert**, seuls les phages sont présents, en **bleu**, seules les bactéries sont présentes, et en **rose**, il n'y a plus ni bactéries, ni phages dans la population.

1. *E. coli C*

C'est avec le génotype sauvage *E. coli C* que nous avons obtenu la coexistence la plus longue, puisque bactéries et virus étaient présents dans toutes les populations au neuvième jour de l'expérimentation.

2. *E. coli C* – $\Delta rfaC$

Dans les populations où les bactéries ensemencées étaient de génotype *E. coli C* – $\Delta rfaC$, nous avons rapidement vu disparaître les bactéries et les virus. Dès le premier jour de coévolution (avec un COI : 10^{-1}) nous avons noté que les bactéries avaient une concentration très faible, en dessous de la valeur choisie comme limite (D.O à 600nm $\ll 0.01$), puis les virus ont disparu à leur tour, et enfin au quatrième jour nous n'avions plus de microorganismes dans les 6 populations. Il est logique que la disparition des virus suive celle des bactéries puisque ils ne peuvent alors plus se multiplier, et ils disparaissent avec les dilutions quotidiennes des populations.

Nous avons cherché à voir si nous pouvions faire durer plus longtemps la coévolution en augmentant la taille du volume transféré d'un jour sur l'autre (100 μ L ou 1mL au lieu de 10 μ L) et en diminuant ainsi la taille du goulot d'étranglement. Mais cela n'a pas eu d'autres conséquences que de décaler la disparition des virus par effet dilution.

Nous n'avons donc pas observé d'émergence de phénotypes résistants quand nous supprimons le gène *rfaC*. Il est vrai que généralement (dans le cas des phages T avec *E. coli* B, et Phi2 infectant *P. fluorescens*) les mutations de résistance modifient le récepteur au phage et bloque l'adsorption. Ici, nous avons totalement supprimé le récepteur des souches qui restent sensibles, ne pouvant empêcher l'adsorption des virus. Nous nous attendions à voir émerger des résistances gênant la réplication ou la lyse (au niveau des gènes *rep* et *slyD* par exemple).

3. *E. coli C* – $\Delta slyD$

Nous avons observé la rapide disparition des virus, dès le premier jour, sans qu'ils aient pu se multiplier. C'est donc qu'il n'y a pas eu contournement de la mutation de résistance comme cela avait pourtant été décrit (cf. p-54).

4. *E. coli C* – $\Delta recC$

C'est avec le génotype *E. coli C* – $\Delta recC$ que nous avons observé le plus de variabilité d'une population à l'autre.

Avec le COI : 10^{-4} , dans 2 populations sur 6 (pop 3 et pop 4) nous avons observé que les bactéries disparaissaient très rapidement, suivies de près par les virus qui ne peuvent plus se multiplier. Dès le troisième jour, nous avons observé la même chose qu'avec *E. coli* C – $\Delta rfaC$; à savoir plus aucun microorganismes. C'est donc que dans ces deux populations, il n'y a pas eu émergence de la résistance.

Dans 3 populations sur 6 (pop 1, pop 2, et pop 6), nous avons observé que les bactéries et les virus coexistaient pendant 6 jours, avant que les bactéries disparaissent. Il y aurait donc eu émergence de la résistance au cours des premiers jours. Cependant, si le coût phénotypique associé aux mutations de résistance était trop important, cela pourrait expliquer que les populations bactériennes ne se soient pas maintenues, et ce notamment à cause des dilutions quotidiennes. A moins que la population virale ait contourné la résistance ayant émergé, et entraîné l'extinction de la population bactérienne.

Enfin dans la dernière population (pop 5), bactéries et virus coexistent jusqu'au jour 8, et il semblerait qu'au jour 9, les virus aient disparus. Cela suggérerait que les bactéries des jours précédents étaient toutes résistantes, et que les virus n'ont plus pût se multiplier sur des hôtes sensibles, ni contourner les résistances émergentes. Soit les mutations résistantes n'entraînent pas de baisse de fitness ce qui leur permet d'envahir la population (Cf. p 34), soit les virus et/ou les bactéries sensibles sont trop peu nombreux et la dilution d'un jour à l'autre suffit à les faire disparaître.

Cette forte variabilité d'une population à l'autre laisse penser que le cours de la coévolution est très sensible à la nature et au moment où les mutations émergent.

b. Densité bactérienne et coexistence bactérie – bactériophage

En regardant l'évolution de la densité bactérienne au cours des 9 jours de coévolution, on recueille une information supplémentaire. En effet, contrairement aux populations d'*E. coli* C, les populations d'*E. coli* C- $\Delta recC$, en présence de PhiX174, n'atteignent pas des densités très importantes (Figure 13). Ces mutants subissent un lourd fardeau, qui réduit d'autant la taille de leur population, ce qui n'est sans doute pas sans conséquences sur la possibilité de voir émerger des mutations avantageuses.

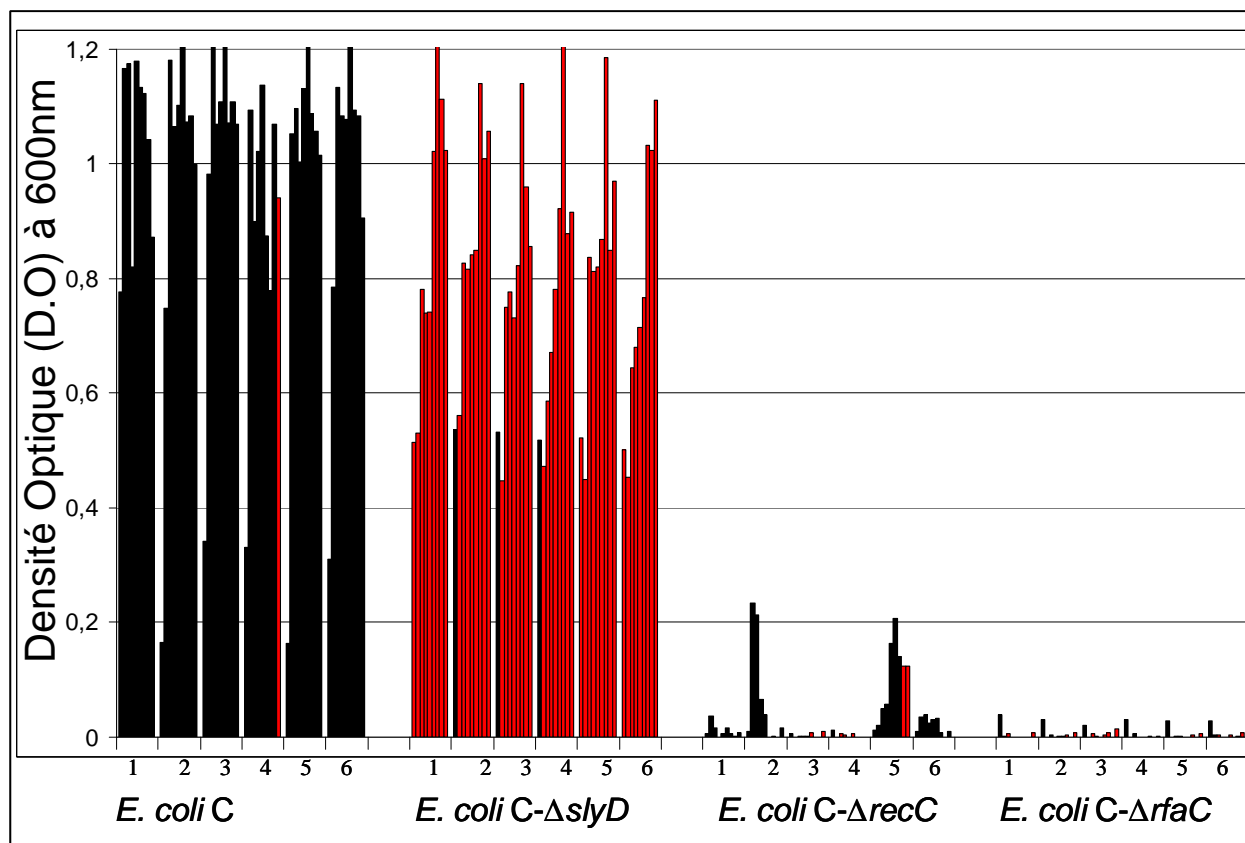


Figure 13 : Evolution des concentrations bactériennes et coexistence bactérie - bactériophage.

L'évolution des D.O (à 600 nm) pour les 6 réplacats des 4 génotypes *E. coli C*, *E. coli C-ΔslyD*, *E. coli C-ΔrecC*, et *E. coli C-ΔrfaC*, sont représentées ici (COI initial de 10^{-4}).

Code couleur : En **noir**, quand il reste des virus dans la population, et en **rouge** quand il n'y en a plus.

c. Valeur sélective des génotypes et potentiel coévolutif

Il est apparu que la valeur sélective associée aux génotypes bactériens pouvait être un critère déterminant, pour que la taille de la population ne limite pas le nombre de mutations avantageuses qui pourraient émerger. En effet, aux vues des informations accompagnant la banque KEIO, la souche *E. coli K-12 - ΔrfaC*, après une culture de nuit, atteindrait une D.O équivalente à 26% de celle atteinte par la souche KEIO sauvage, contre 58% pour *E. coli K-12 - ΔrecC* et 67% pour *E. coli K-12 - ΔslyD*. Le fait de ne pas observer des mutations de résistance envahir les populations d'*E. coli C - ΔrfaC*, pourrait-il être expliqué par la trop faible valeur sélective du mutant ? De même pour *E. coli C - ΔrecC*, où l'on n'observe l'émergence de la résistance que dans 4 cas sur 6 ?

Nous avons voulu vérifier que la valeur sélective d'*E. coli* C - $\Delta rfaC$ était significativement diminuée par rapport à *E. coli* C et les autres mutants. Nous avons donc comparé leurs courbes de croissance en milieu liquide (dans 200 μ L de LC, à 37°C, avec une agitation régulière, et en 8 réplicats par génotype) (Figure 14). Nous avons constaté que les génotypes mutants poussent tous significativement moins bien que la souche sauvage *E. coli* C. Il existe aussi une différence de croissance minimale entre *E. coli* C - $\Delta recC$ et d'*E. coli* C - $\Delta rfaC$.

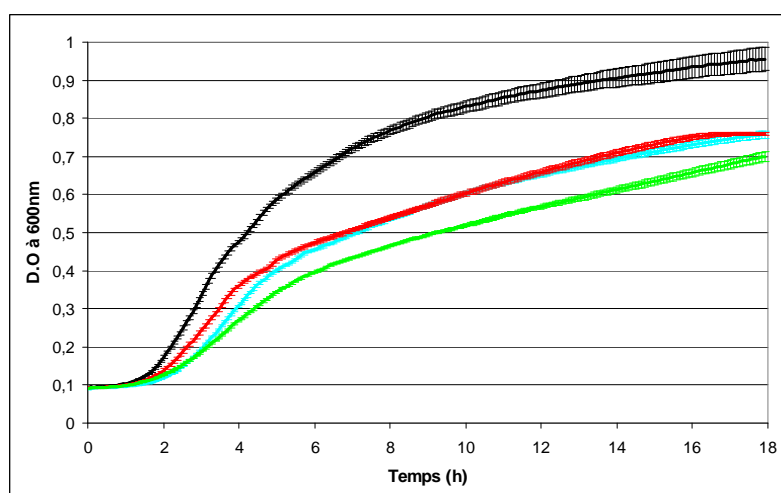


Figure 14 : Croissance des différents génotypes en milieu liquide.

Moyennes et écart-types calculés sur 8 réplicats par génotypes (D.O à 600nm).

Code couleur : En **noir** *E.coli* C, en **vert** *E.coli* C $\Delta-recC$, en **rouge** *E.coli* C $\Delta-slyD$, et en **bleu** *E.coli* C $\Delta-rfaC$.

Afin de séparer l'effet de la faible croissance de l'effet de la mutation spécifique à l'interaction bactérie – bactériophage, nous avons construit un mutant « contrôle », *E. coli* C - $\Delta rpmE$. Le gène *rpmE*, n'est pas sensé intervenir dans la multiplication de PhiX174, et la suppression de ce gène est associée à une très faible valeur sélective (D.O équivalente à 30% de celle atteinte par la souche KEIO sauvage). Dans ce contexte génotypique, et dans des conditions expérimentales de coévolution identiques à celles présentées ici, nous n'avons pas observé d'extinction de population bactérienne. Cela suggère que les génotypes que nous avons utilisés affectent la coévolution avant tout en raison de leur spécificité génétique plus qu'en raison de leur croissance diminuée. La faible valeur sélective des mutants d'*E. coli* C - $\Delta rfaC$ et *E. coli* C - $\Delta recC$ ne suffit donc pas pour expliquer le fait qu'on n'ait pas observé de coévolution « durable » avec *E. coli* C - $\Delta rfaC$ ou *E. coli* C - $\Delta recC$ et PhiX174.

4. Conclusions

Par cette étude, nous avons établi que la durée de coévolution d'un système biologique dépendait fortement des génotypes en présence. En effet, si une faible valeur sélective est associée à l'un des génotypes, alors la taille de la population en sera réduite d'autant, ainsi que la probabilité d'émergence des mutations avantageuses. Toutefois, il faut ajouter à cela la notion d'épistasie ; l'émergence d'une mutation dans un contexte génétique donné modifiant le nombre et la nature des mutations pouvant à leur tour émerger. Ainsi, en inoculant des génotypes différents au premier jour de la coévolution, nous avons altéré le potentiel évolutif des bactéries. Ceci pourrait expliquer qu'avec le génotype $\Delta recC$ on ait parfois observé l'émergence de la résistance, et pas avec le génotype $\Delta rfaC$.

Aux vues de ces résultats, nous avons fait le choix de prendre le système biologique « sauvage » *E. coli* C / PhiX174 pour étudier l'évolution de la pression de sélection induite par les virus sur les bactéries en coévolution. En effet, nous avons montré que c'est avec ce tandem que la coexistence dure le plus longtemps. Nous avons opté pour des conditions expérimentales similaires à celles utilisées ici, à savoir le même milieu (1/4X LC), la même agitation, et pas de migration.

5. Perspectives

Il pourrait être intéressant d'étudier de façon plus approfondie la coévolution entre *E. coli* C - $\Delta recC$ et PhiX174 afin de comprendre comment elle peut conduire soit à l'extinction des bactéries, soit à l'extinction des phages. Nous pourrions, dans ce but, isoler chaque jour des clones bactériens et étudier leur résistance au virus ancestral, mais aussi aux virus coévoluant avec elles. Est-ce que dans les populations où les bactéries s'éteignent en premier, les virus évoluent vers une plus grande infectivité, et est-ce que le coût phénotypique associé à la résistance est si important qu'il empêche les bactéries de persister ? Est-ce que, dans les populations où les virus disparaissent, la résistance qui émerge est « absolue » ? Et dans ce cas, quelle mutation explique ce phénotype ?

III. Taux d'évolution du bactériophage PhiX174 en coévolution continue avec *E. coli* C

1. Contexte

Nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, les phages influencent fortement la dynamique des populations bactériennes (transferts horizontaux, goulots d'étranglement, recyclage des nutriments...). La forte pression de sélection résultante, qui favorise l'émergence des bactéries évitant ou résistant à la lyse, s'ajoute aux pressions de sélection engendrées par le milieu abiotique (structuration de l'espace, richesse du milieu...). Nous avons souhaité étudier l'évolution de cette pression de sélection d'origine virale sur la population bactérienne dans un contexte de coévolution.

Dans ce sens, toutes choses égales par ailleurs, nous avons choisi de comparer le taux d'évolution des bactériophages en coévolution ou non avec des bactéries. Nous avons considéré que ce paramètre mesure indirectement la pression de sélection exercée par les bactériophages sur les bactéries. En effet, nous pouvons faire l'hypothèse que plus un bactériophage a accumulé de mutations, et si celles-ci semblent correspondre à des mutations d'adaptation à l'hôte, plus la coévolution a été dynamique ce qui est le reflet d'une pression de sélection intense.

Pour étudier cette question, nous avons mis en place deux traitements. Les bactériophages du premier protocole ont été confrontés à des bactéries naïves et sensibles que nous renouvelions chaque jour au moment du transfert dans un nouveau milieu. Dans le second protocole, nous n'avons pas séparé les bactéries des bactériophages et nous avons transféré quotidiennement l'ensemble de la population dans un nouveau milieu.

Nous avons tout d'abord vérifié qu'une coévolution dynamique s'établissait entre les bactéries et les bactériophages. Puis nous avons séquencé les virus récupérés au vingtième jour de l'expérimentation, et nous avons analysé l'accumulation des mutations dans les deux traitements. Nous avons été étonné de ne pas voir de différence significative entre le taux d'évolution des virus en coévolution continue avec les bactéries et les virus du protocole de contrôle. Nous avons discuté de ce qui pourrait expliquer ce résultat.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous sous la forme de l'article « en préparation », qui sera soumis prochainement.

2. Article « Viral evolution rate in a coevolving *Escherichia coli* C - PhiX174 system »

Viral evolution rate in a coevolving *Escherichia coli* C - PhiX174 system

Alix Michel¹, Cécile Gateau¹, Olivier Tenaillon¹

INSERM U722 and Université Paris 7, Faculté de Médecine, site Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France,

ABSTRACT

Abiotic and biotic environment parameters influence the selective forces acting on microbial populations. Here, we studied the impact of antagonistic coevolution interactions between *Escherichia coli* C and PhiX174 on the rate of viral molecular evolution. We considered that the viral evolution rate would reflect the dynamic of the coevolution and thus the strength of the corresponding selective pressure on bacteria. We found that most adaptation occurred in the part of the phage genome involved in host-parasite interaction. However we could not detect clear differences in the rates of evolution between continuously coevolving viruses and the ones facing everyday renewed bacteria. It seems that the costs associated with virulence and resistance lead to a stable equilibrium of infectious and non-infectious phages together with sensitive and resistant bacteria, and may quickly limit the adaptive rate in our system.

BACKGROUND

Bacteriophages, or phages, and bacteria are ubiquitous microorganisms; their total number reaches respectively 10^{31} and 10^{30} individuals on Earth. In aquatic ecosystems phages are responsible for about 10 to 50% of the bacterial mortality(59). This host-parasite interaction affects the whole ecosystem stability. Indeed it impacts on the resource cycles with the release of nutrients and debris from lysed cells(58), and it promotes bacterial diversity both through

phage mediated horizontal gene transfers and phage mediated cycles in population densities(113).

As a consequence, phage virulence induces a strong selective pressure on bacterial population favouring those that turn resistant to phages. In order to understand bacterial population dynamics, the potential evolution of bacterial resistance to phages and how those can counteract these resistances have to be considered. While studies in the wild tend to be now more popular(120), for almost thirty years phage-bacteria interactions have been studied both through experimental evolution in the laboratory under very controlled environments, and genetic studies. It has been shown that some genes involved in phage resistance, such as *malT*, are submitted to diversifying selection in the wild(96), which suggests a recurrent action of phages on such genes and presumably cycles of coevolution of both partners. The outcome of coevolution is really dependent of the organisms studied. For instance *Escherichia coli* B can delete the T5 receptor with no cost under laboratory conditions and therefore the extinction of phages directly follows the emergence of this resistance. *A contrario*, *E. coli* B and T4 can coexist over a long period(21). Among the experimental bacteria-phage systems tested only a handful have appeared stable enough to study the coevolution, with both phages and bacteria evolving to counteract the changes occurring in the other ones (28)

The diversifying selection observed on genes involved in host-parasite interactions is not restricted to bacteria-phage systems, it can also be found when one is facing an immune system or in plant resistance genes. In an even more general framework any biotic antagonist interaction (predator-prey or even within species sexual conflicts) is supposed to drive an accelerated evolution. As illustrated by Van Vaalen in 1973 with his Red Queen metaphor, the biotic component of the environment is likely to drive most of the selection for change within an organism. One underlying assumption of such a vision is that in a constant environment the rate of molecular evolution should be slower and less targeted than in a system in which antagonistic biotic interactions are present.

To test such a hypothesis we developed a new experimental bacteria-phage coevolution system which benefits from the massive knowledge accumulated on both partners: *E. coli* and PhiX174. This system is particularly relevant to measure the rate of evolution since the phage genome is so small (5386 pb) that it can be easily fully sequenced after evolution. To simulate a changing biotic environment we let the bacteria and phage evolve together (COEV

treatment) while to simulate a constant biotic environment, we chose to replace every day the bacterial population from the culture tubes with a fresh ancestral bacterial population, and therefore subject the phage population to directional evolution (DIREV). We show that most adaptation occurred in the genes involved in host-parasite interaction, but we could not detect clear differences in the rates of evolution between the two experimental conditions. We therefore looked for the dynamic of the coevolution factors that could explain this observation.

METHODS

Strains

PhiX174 (DSMZ4497) and its reference host *E. coli* C (DSM13127) were obtained from the DSMZ German institute. A solution stock of PhiX174 was made on the *E. coli* C, filtered twice and conserved at 4°C (10^9 PFU/mL).

Evolution protocols

On the first day, 12 tubes (50 mL) were filled with 10mL of a Luria Casein (LC) broth diluted 4 times into MgSO_4 (10^{-2}M), supplemented with Infective Juice (IJ) (10mL/1L of the solution stock: CaCl_2 -0.5M and MgCl_2 -1M)(106). We had found that *E. coli* C - PhiX174 coexistence lasts more in this diluted broth (data not shown). In each tube, *E. coli* C (10 μ L of the overnight culture from a single colony) was inoculated with PhiX174 (10 μ L of the solution stock, *i.e.* 10^7 PFU, Coefficient Of Infection (COI): 1. The tubes were incubated at 33°C overnight with a constant agitation of 130 rpm; 6 tubes followed the DIREV protocol (E1 to E6), and 6 the COEV protocol (C1 to C6).

In the DIREV treatment, every day, 1mL of the population was centrifuged at 10 000 Revolution Per Minute (RPM) for 5 min with 50 μ L of chloroform, to get rid of bacteria. Then 10 μ L of this supernatant were inoculated in a new tube (10mL 1/4X LC with IJ) along with 10 μ L of a fresh overnight culture of *E. coli* C. In the COEV protocol, 10 μ L of the population were directly inoculated into a new tube (10mL 1/4X LC with IJ). The 12 tubes, along with a control tube only filled with broth for testing contaminations, were incubated at 33°C overnight with a constant agitation of 130 RPM.

Storage

We collected every day 500µL of each population and mixed it with 500µL of 80% glycerol for storage at -20°C.

Coexistence of bacteria and phages

Every day, the Optical Density (OD) of the 12 populations was measured at 600nm. We considered that bacteria were present in the population when the OD was above 0.01.

In order to determine whether phages were still present or not, we tested the lysis power of the different populations on the *E. coli* C ancestor. An *E. coli* C layer was made on LC square Petri dishes, pouring 9mL of soft LC-agar (agarose 7.5g/L LC) with 30µL of IJ and 300µL of *E. coli* C overnight culture(106). We dropped off 5µL of the 12 different populations down on the *E. coli* C layer. We considered that phages were present when a clear zone appeared after one night of incubation at 33°C. Some populations were titrated more precisely on the ancestor host (1st day or D1, D3, D5, D8, D10, D13, D15, D18 and D20).

Isolation of bacteria in the COEV treatment

Three populations following the COEV protocol (C1, C2 and C3) were streaked every day on Petri dishes. The plates were incubated at 33°C on overnight and 10 separate colonies per population, chosen randomly, were streaked again, and inoculated in LC for storage in glycerol at -20°C.

Resistance or susceptibility test

The bacterial clones isolated every day in C1, C2 and C3 were tested for their resistance or susceptibility to the ancestor and coevolved phages. Every overnight culture (300µL) was mixed with 3mL of soft-agar with 30µL of the IJ, it was poured in a small Petri dish, and we deposited 2µL droplets on the plates of the PhiX174 ancestor solution stock. The C1 clones isolated on D1, D3, D5, D8, D10, D12, D14 and D16 were mixed with 3mL of soft-agar complemented with 30µL of IJ, poured on a LC Petri dish and we dropped off 2µL droplets of each C1 entire population generation (considering that the resistant bacteria in those stored population wouldn't bias the results).

We concluded that the bacteria were sensitive when the drop of phages was associated with an inhibition of bacterial growth after over-night incubation at 33°C. When the zone of the droplet was non-differentiable from the bacterial layer, we considered that the bacteria were resistant.

Bacterial growth curve

Bacterial clones isolated on D20 from C1, C2 and C3, were inoculated in fresh LC in a microplate deep-well on over-night, with agitation at 37°C. Then we put 10µL of these cultures with 190 µL of LC supplemented with IJ, in the incubator (TECAN®, infinite 200, Austria) for a growth curve of 18h at 37°C and regular shaking.

Phage concentrations

To evaluate the evolution of the concentration of phages during the two protocols, we titrated them on the ancestor host *E. coli* C, using the solution stocks glycerolated on day D1, D3, D5, D8, D10, D13, D15, D18, and D20. We diluted those solutions into fresh LC (dilution from 10^{-1} to 10^{-6}), and deposited 2µL droplets on an *E. coli* C layer.

Isolation of phages on the 20th day

The supernatant of the 12 populations of D20 were mixed with the *E. coli* C ancestor at different dilutions. Five lysis plaques (A to E) were chosen randomly per population, and were diluted in 1mL LC eppendorff tube, they were vortexed with 50µL chloroform, and centrifuged for 5 min, then the supernatant were stored at 4°C. In the same way, we isolated 5 lysis plaques of the ancestor PhiX174 solution for a non-evolving control.

Sequencing

We sequenced some phages isolated on D20: 4 evolved (E2A, E3A, E4A, E6A), 2 coevolved (C1A, C6A) and 1 ancestor (PhiXA). We amplified their genome with two Polymerase Chain Reaction (PCR), PCR1 with the primers 16(+) and 2629(-) and PCR2 with the primers 184(-) and 2494(+). The (+) means that the primers had the same sequence as PhiX174, the (-) that the primers are reverse-complement of PhiX174 sequence. The number corresponds to the first base of the primer within PhiX174, all primers are 20bp long. We chose 10 primers for sequencing: 674(-), 1106(-), 1629(-), 2181(-), 2629(-) for PCR1 and 3127(-), 3637(-), 4052(-),

4602(-), 5126(-), 184(-) for PCR2. Obtained sequences were analysed with the softwares Bioedit, and ClustalW.

Day 20th phage lysis plaque size

The solution stocks of the 50 phages isolated on D20 (they were no phages in C2 and C3 on D20), along with the ancestor PhiX174 viruses ones were titrated on *E. coli* C, as described above. We spread some dilutions of these solutions into a top-agar mix (about 10 to 50 plaques per Petri dish). We did this protocol in two replicates. We mixed up the Petri dishes in the incubator, at 33°C, not to consider the position of the plates and the influence of the heater. On the next day we took pictures of the plates with Biocapt, and analysed them with a home-made software that gave us the size (in pixel) and the total number of plaques per Petri dishes.

Lysis curves of the sequenced viruses

The seven sequenced viruses were inoculated with *E. coli* C, into 6 replicates, in a microtiter plate (COI: 10^{-5} , LC supplemented with IJ). It was incubated at 37°C in the TECAN, the OD at 600nm was measured regularly, and the plaque was agitated.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacteria and phages coexistence

We first wanted to test if coexistence of phiX174 and *E. coli* C was possible as many previous bacteria-phage systems have failed at that stage. As resources availability might be an important parameter, we first ran some set of experiments with various concentrations of resources, and figured out that LC diluted 4 times in a salt media provided the highest rate of coexistence of both partners (data not shown). Bacterial concentrations from each population were measured every day, as well as the phage presence. During the DIREV treatment, we observed that phages were maintained until D20, with some punctual extinction of bacteria (Figure IA). In the COEV treatment, in 4 of 6 populations bacteria and phages were still coexisting on D20 (C1, C4, C5 and C6), while phages went extinct around D11 or D12 in the population C2 and C3 (Figure IB).

To see if some genetic changes linked to antagonistic coevolution had occurred in both partners we first made a simple test. We checked in population C1 if the evolved bacteria were all resistant to the ancestral phage. As it appeared to be the case it suggested that both the phage and the bacteria had coevolved to some extent.

Evolution rate of virus coevolving continuously with bacteria or not

To assess if the presence of coevolution had accelerated the rate of molecular adaptation, we sequenced both evolved genome and the ancestral one. The sequence of the ancestor virus differs from the Sanger sequence with 7 mutations (data not shown). Due to small plaque sizes and two phage population extinctions, we could only sequence 2 COEV lines and 4 DIREV ones (we wanted to avoid plating the phage at high density to prevent *de novo* evolution on the plate). We first identified the mutations that had appeared during the experiment, and studied the impact of these mutations on the amino acid composition of the viral proteins (Table I). We found 25 different substitutions, for a total of 41 mutation events. Most substitutions (80%) appeared uniquely in one or the other treatment: 11 in the DIREV evolved viruses and 9 in the COEV ones. Some (5, 20%) appeared in both treatments. Some substitutions (7, 28%) emerged in parallel in different lines. Besides the parallel mutations we observed, some substitutions (6, 24%), emerging in different isolates or not, had already been described in literature. This information is important, since it implies that unique substitutions could be selected in independent evolved lineages. T1354A and G2015C had emerged in a chemostat coevolution protocol with continuous supply in *E. coli* C(124); G1319A had been considered as a compensatory mutation(97). Finally C1460G and C2085T had been observed in adaptation protocol to alternating hosts (*E. coli* C and *Salmonella*)(29, 39).

In both treatments, as expected under a model of coevolution, the mutations were highly clustered, hitting only genes involved in capsid or procapsid. Indeed while gene *F* represent 24% of the genome, it harbored more than 70% of all mutations (Fisher exact test $p=5 \cdot 10^{-12}$). In total capsid genes which represents 56% of the genome harbored 84% of mutations (Fisher exact test $p=5 \cdot 10^{-5}$). As expected for a selection driven molecular evolution, most mutations were non-synonymous with a total ratio of synonymous mutations over non-synonymous of 1.75 and 1.5 for COEV and DIREV respectively. Yet four of the five mutations occurring in gene *D* were synonymous. This is coherent with the observation Burch and Fane made that this gene is the most conserved one in PhiX174's *Microviridae* family(30), but does not explain why 5 mutations were found in this gene compared to 0 in gene *A* which is three times

larger (Fisher exact test $p=6 \cdot 10^{-4}$), which suggests that *D* might be a locus with strong selective pressure on DNA secondary structures.

While this distribution of mutations across the genome comforts the idea of coevolution, there was no power to detect any differences in patterns or rates among the two treatments. Even if DIREV lines had slightly lower number of mutations (3, 7, 7 and 8) compared to COEV (8 and 8), the difference was not significant. Hence, surprisingly we can conclude that even if the phages of the COEV treatment were continuously coevolving with bacteria, their evolution rate isn't significantly increased in comparison to the phages of the DIREV treatment as we had expected.

We looked for factors that could contribute to this observation. The rate of adaptive evolution of both partners is directly correlated to the number of beneficial mutation generated at each generation and to their effect on fitness. Therefore we studied population sizes, and the intensity of selection imposed on each antagonist.

Viral population size

We first focused on viral population sizes (Figure II). Even if we do not take into account the C2 and C3 populations where phages go extinct about D11 or D12, it appeared that the viral concentration was still significantly (t test significant, $p<0.05$) lower in the COEV treatment after day 8 compared to DIREV treatment. This difference might be a confounding effect in the rate of evolution, it is yet hard to quantify its importance without a proper integrated model of coevolution, as it will affect both the capacity of the phage population to respond to selection, but will also decrease the selective pressure imposed by phages on bacteria.

Cost of resistance/virulence

For biotic interactions to drive faster adaptation, one need the selective pressure associated with biotic interactions to be stronger than the selective advantage of beneficial mutations in a constant environment. When one talk about resistance and virulence, very intense selective pressure are envisioned, however, if the selective pressure imposed by each partner on its protagonist is reduced then the rate of coevolution may be reduced. Such a reduced rate of coevolution can be triggered by limited gain associated with the new beneficial mutations and/or by a attenuated selective pressure imposed on the antagonist. For instance, as suggested in most gene for gene models of evolution, if extended resistance or extended host

range come at a cost then each corresponding allele will spread through populations more slowly than the previous one. The system can eventually come to a polymorphic equilibrium when the cost of further resistance /virulence allele is on the same order than its associated benefit. To test if such a process existed in our experimental system we used two approaches. On the one hand we focused on the virulence on the ancestor bacterial genotype of the phages isolated at D20. On the other hand we followed the evolution of resistance and host range of the phages through the COEV C1 population to see if the interactions between phages and bacteria were compatible with the emergence of reduced viral induced selection pressure on bacteria.

Virulence and productivity of the coevolved bacteriophages on the ancestor host

The impact of the D20 coevolved viruses on the ancestor host growth curve was measured and compared with the impact of the ancestor bacteriophage and the D20 viruses from COEV treatment (Figure III). The ancestral bacteria inoculated without phages grow exponentially. In the wells where phages were added, the bacterial concentration increased first and then dropped off dramatically. According to the shape of the lysis curves, the ancestor virus (the green line) was the most virulent virus on the reference strain. Indeed, we observed a significantly reduced virulence for most of the D20 viruses, in comparison to the ancestor but interestingly we can't clearly distinguish the viruses from the DIREV treatment (black lines) from those from COEV (red lines). However, this observation was consistent with the existence of some cost associated with the mutations selected in our treatment.

To further assess this cost we plated on the ancestor host, populations derived from 5 clones isolated from each of the viral populations at D20. Indeed plaque growth may be a more sensitive test than the previous test as it reflects the product of many more rounds of infections (Figure IV). Again, both DIREV and COEV viral populations had a significantly decreased productivity, as measured by the plaque sizes, in comparison to the ancestor bacteriophage (both ANOVA significant, $p < 10^{-15}$). This time however, there was a significant difference between treatments (ANOVA significant, $p < 10^{-15}$). The DIREV viruses were more fit than the COEV viruses that had dramatically reduced plaque size on the ancestor host. It suggests that the loss in productivity is higher when the viruses are facing continuously coevolving bacteria, as if the phages modified more drastically the optimal parameters of the infection on wild type *E. coli* C. Those two results support the hypothesis of a reduced virulence of the coevolved bacteriophages (at least, on the ancestor host).

Resistance emergence in bacteria-phage continuously coevolving populations

To see under which conditions this potential reduction of virulence of the phage was observed we decided to look more carefully in population C1 how the phages and bacteria could infect or resist to one another. We used phage populations of all 20 first days and confronted them to 10 independent clones sampled from the bacterial populations of D1, D3, D5, D8, D10, D12, D14 and D16. When the drop of phages was associated with an inhibition of bacterial growth, the bacteria was said to be sensitive to the phage generation. Out of the 1600 such confrontations, we could identify 30 different patterns of bacterial resistance (including the ancestor) and 18 patterns of host range for the phage populations. After sorting the matrix ranks and columns, we could identify a matrix of infection (Figure VA) globally but not exclusively compatible with a gene for gene model, though we do not know how many mutations are required to transit from one pattern to another. Indeed, the lower diagonal of the matrix is full with infective crosses, which means that there tend to be a hierarchy in both resistance and host range: mostly the broad host range phage can infect some of the most resistant bacteria. Under such a system, if there is no cost associated with wider host-range or resistance, one would expect selection of the broadest host range for the phage and the highest resistance for the bacteria, in a continued arm race. When we followed how global host range and resistance evolved, (Figure VB and C) we were however surprised to see the most resistant bacteria and the broadest host range phages emerged early in the coevolution and then to see intermediate resistance and host range take over. This is however compatible with the existence of costs for both resistance and larger host range. Due to variable mutation rate the most resistant and larger host range may have emerged first, but then due to their cost, intermediate phenotypes with a lesser cost may swept through. The picture is therefore more complex than predicted from simple models, but the maintenance of a large fraction of sensitive bacteria suggests that the load imposed by phage is much reduced later in the evolution. Moreover, the strong variability in resistance phenotype present in the population suggests that the bacterial population is not undergoing some complete selective sweep in which a new resistance allele invades the whole population, but rather some equilibrium among these resistance alleles presumably driven by their cost. Hence as suggested, we think that the selective pressure induced by phage predation may not be as strong throughout the whole coevolution and may therefore moderate the potential acceleration of adaptation suggested.

Homogeneity of the bacterial population in the control treatment populations

Finally it is worth noting that what we used as a control of constant environment may not be the ideal control. In the DIREV treatment, most days, some resistant bacterial clones are isolated from the populations just before the transfer of the viruses into a fresh culture medium. This means that even in that setting, resistant genotypes have emerged and replaced naïve sensitive ones. Moreover, since every day we inoculated fresh bacteria, different resistance mutations might have been selected for, upsetting our assumption that the bacterial population was genetically homogeneous in the control treatment. We could have chosen a lower cycle length to avoid such an emergence of resistance. However, the cycle time need to be large enough to allow 6 to 10 bacterial generations which may require at least 4 to 5 hours with *E. coli* C which is not a fast growing *E. coli*. However, as succession of 4 to 5 hours cycles are not fully compatible with laboratory work, storage of populations between cycles becomes an issue since it may impact the bacteria-phage interaction dynamics.

Concluding remarks

Overall we have observed a rapid evolution in both experimental conditions that was concentrated in a very specific part of the genome: the protein F which is known to mediate the recognition of the host. We could not see a faster rate of evolution in the COEV treatment but it may be due to the fact that the control was not perfect and to the fact that viral population sizes were lower in the coevolution than in the control populations. Finally we suggest through our system that resistance and extended host range may come at a cost that may lead in the end to a reduced selective pressure imposed by the phage on the bacterial population which in turn may result in a less dynamical evolution.

The present work presents a new experimental system of phage bacteria coevolution that appears to be quite rich as most viral populations had difference patterns of host range and up to 30 different resistance phenotypes were isolated among bacteria. As both partners are particularly well characterised and can be genetically modified, this system may be powerful to unravel the molecular bases of a bacteria-phage interaction.

Acknowledgments

The authors want to thank Olivier Clermont for its help on sequencing. A. M. was supported by a fellowship from the French Research Ministry, and O. T. was supported by the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-05-JCJC-0136-0).

Figure I - Bacteria and phages coexistence.

The replicates are horizontally distributed, and the days are vertically presented. **A**: DIREV treatment, **B**: COEV treatment.

Color code: yellow boxes represent populations where both bacteria and phages are present; green boxes represent populations where no bacteria are detected ($OD < 0.01$) but phages are present; blue boxes represent populations where no phages are detected (no lysis on *E. coli* C ancestor), but bacteria are still present.

A	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20
E1																				
E2																				
E3																				
E4																				
E5																				
E6																				
B																				
C1																				
C2																				
C3																				
C4																				
C5																				
C6																				

Table I - Mutations found in the evolved and coevolved lines

Isolates	Mutation	Amino acid number in affected protein	Amino acid substitution	References quoting the mutations
E6, C6	G503A	D38		
E2	G505C	D39	S-T	
E3	T539A	D50		
C1	G557A	D56		
C6	C870T	J8	S-F	(S-F)(125)
C1	T1230C	F77	V-A	
E4, E6	A1242G	F81	Q-R	(Q-R)(125)
E3	G1319A	F107	A-T	
E3, E6	T1354A	F118	N-K	(N->K)(124)
C6	G1427C	F143	D-H	
C1	C1460G	F154	Q-E	(Q->E)(123) ; (Q->E)(39) (Q-E)(125)
E6	G1469T	F157	A-S	
E3, C6	C1547A	F183	P-Q	
E2	C1554G	F185	D-E	
C1, C6, E2, E3, E4, E6	A1650G	F217		
C1	T1784G	F262	F-C	
C1, C6, E4, E3, E2	G2015C	F339	D-H	(D->N)(124)
C6, E3, E2, E6	C2085T	F362	A-V	(syn) (124); (A->V)(123) ; (Q-E)(125)
E6	A2122C	F374	T-P	
C1	C2130T	F377		
C6	C2130G	F377	F-L	
E3	A2899G	G169	I-V	
E2	A3138G	H70	S-G	
C1	G3139A	H70	S-N	
E2	C3154T	H75	A-V	
TOTAL	41			
	30			

Figure II - Viral concentrations in COEV and DIREV populations.

Titration was made on *E. coli* C ancestor. The means were calculated over the 6 replicates (E1-E6) from DIREV treatment, or the 4 replicates (C1, C4-C6) from the COEV treatment, along with the standard deviation.

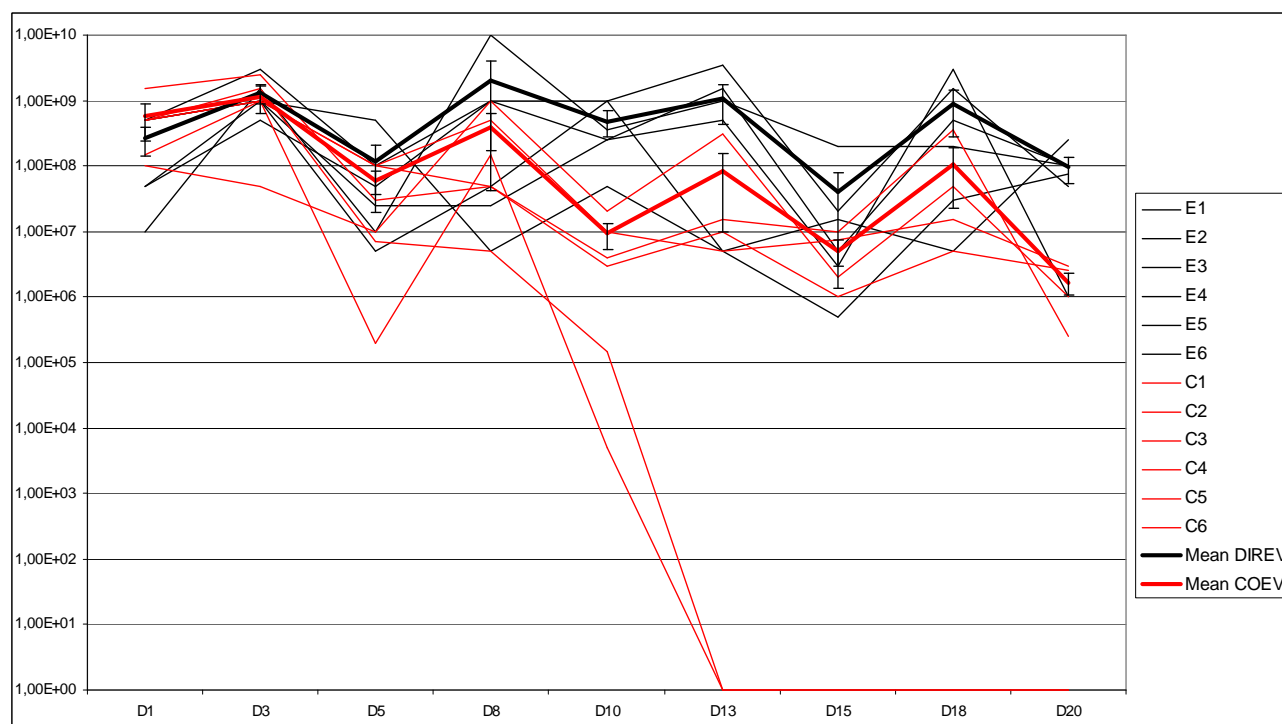


Figure III - Lysis curves of the evolved viruses on the ancestor host.

Color code: The blue line corresponds to the bacterial growth without phages. In green is represented the ancestral virus lysis. The red lines (COEV) and the black lines (DIREV) correspond to the lysis of the ancestor host by the D20 evolved viruses.

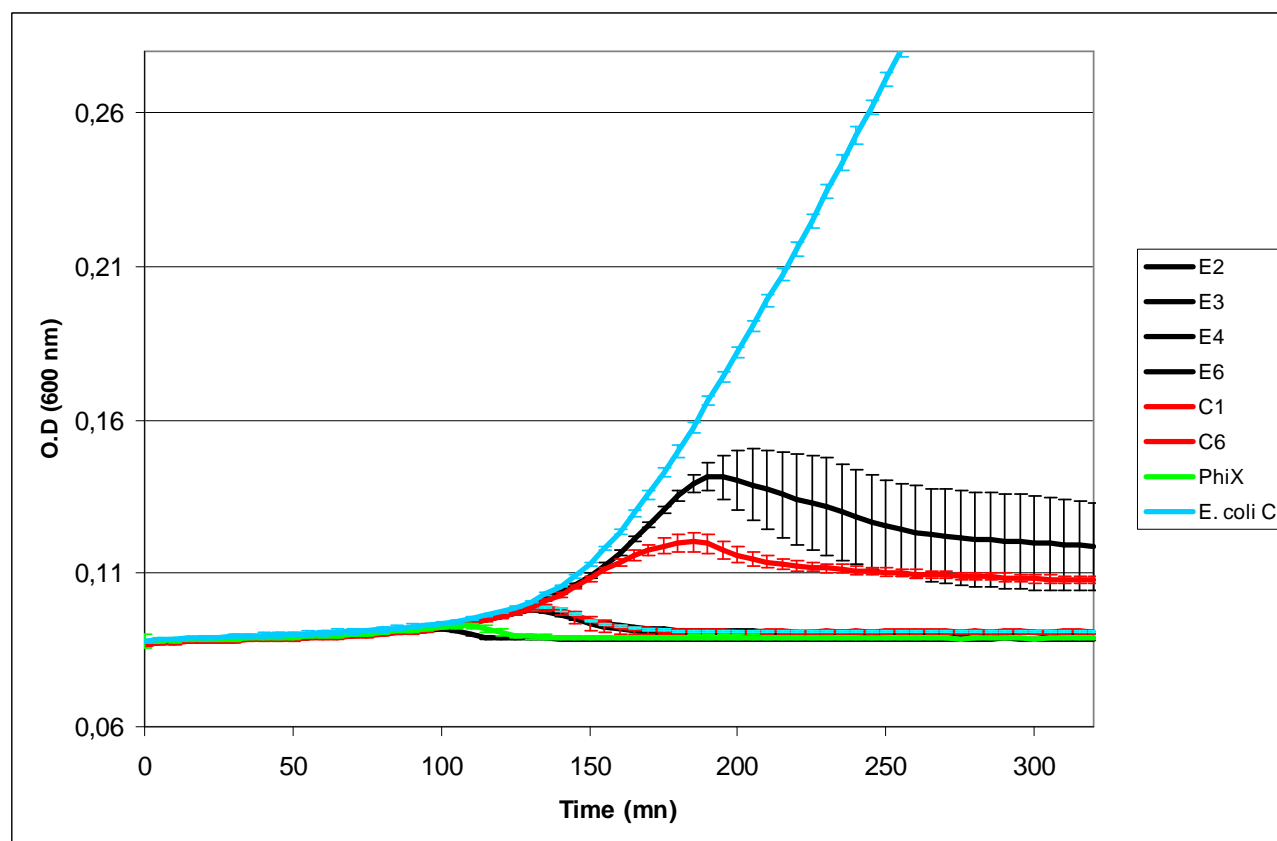


Figure IV - Lysis plaque sizes of the evolved viruses on the ancestor host.

Color code: The blue line corresponds to the ancestral virus lysis plaque size. The red ones (COEV) and the black ones (DIREV) correspond to the lysis by the D20 evolved viruses of the ancestor host.

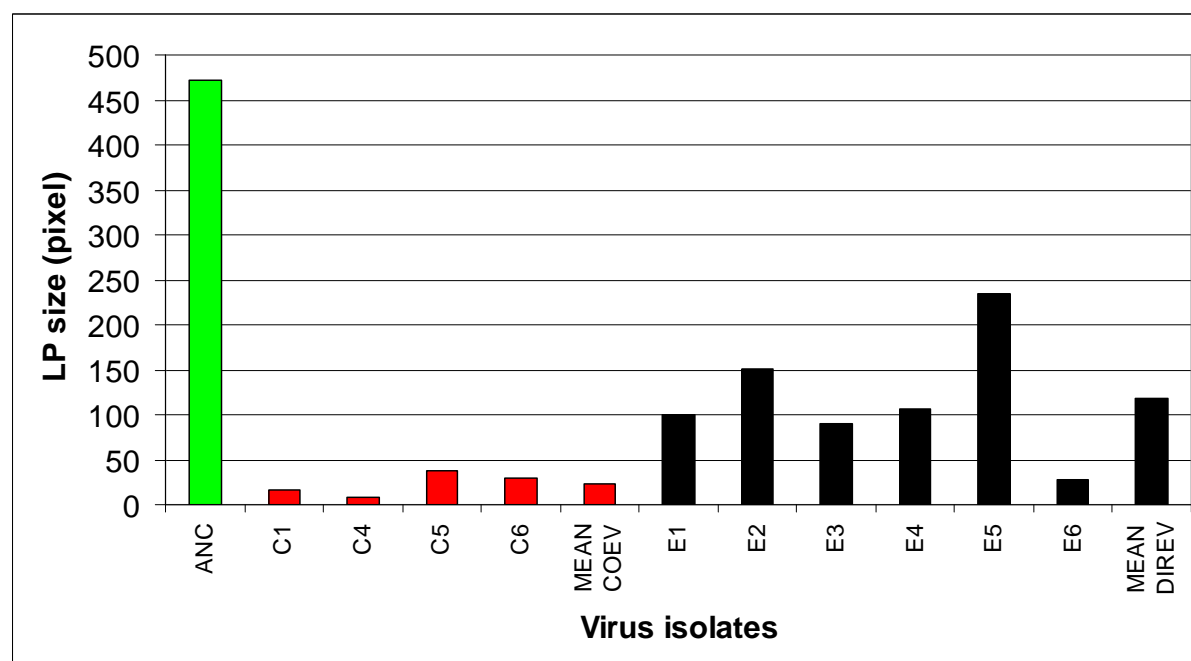
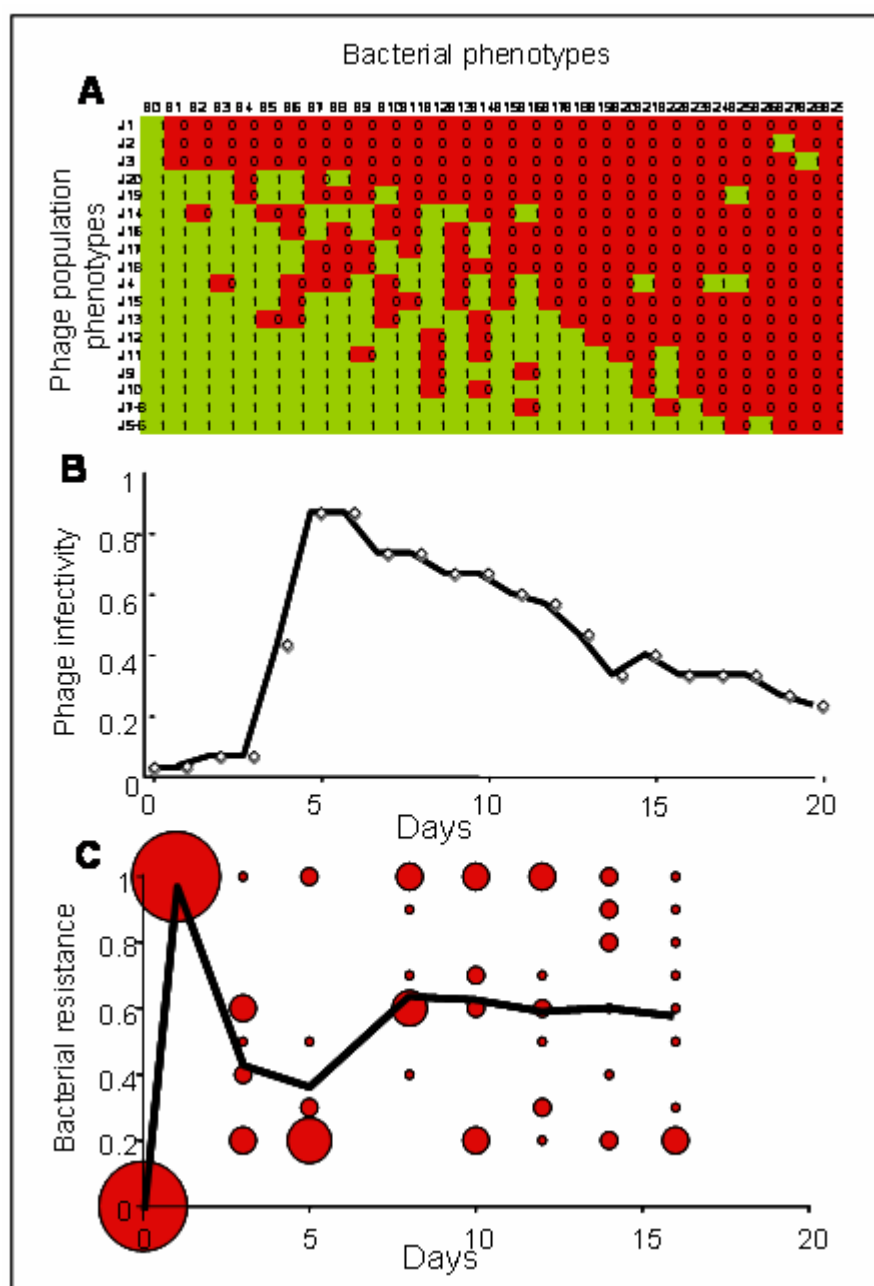


Figure V - Bacterial resistance and host range patterns.

A: Matrix of interaction: all the different patterns of phage population host range and bacterial resistance were retained to build this matrix in which a 1 (green) corresponds to a possible infection and a 0 (red) to the resistance of the bacteria.

B: Based on the previous matrix, the host range of phage populations was followed through time; it corresponds to the fraction of bacterial sensitive phenotypes.

C: Based on the previous matrix, the average resistance to phages was followed through time, it corresponds to the fraction of phage populations that are non-infectious. The line indicates the mean resistance among the 10 clones isolated on that day, while the red circles indicate the resistance of each clones, the diameter of the circle reflecting the number of clones sharing the same resistance.



3. Commentaires de l'article : résultats et discussion

Au premier jour de l'expérimentation, nous avonsensemencé *E. coli* C et PhiX174 dans 12 populations (milieu 1/4X LC, agitation continue et incubation à 33°C). La moitié a subit le protocole DIREV, et le reste le protocole COEV. Dans le protocole DIREV, nous avons séparé chaque jour les bactéries des virus (centrifugation et traitement au chloroforme), pour ne transférer qu'un échantillon de la population virale dans un milieu « propre », auquel nous avons ajouté des bactéries *E. coli* C ancestrales. Pour le protocole COEV, nous avons

transféré quotidiennement un échantillon de l'ensemble de la population dans un milieu « propre ». Nous avons considéré que seule l'évolution des bactéries changeait d'un protocole à l'autre ; la population bactérienne dans bouillon de culture DIREV étant plus ou moins homogène génétiquement et sensible, et celle des bouillons de culture COEV coévoluant de façon continue avec les bactériophages.

a. Coévolution dynamique entre E. coli et PhiX174

Tous les jours, nous avons vérifié que les bactéries et les bactériophages étaient présents dans chacune des populations. Nous avons noté que les virus se sont maintenus dans les 6 populations DIREV (E1 à E6) et dans 4 populations COEV (C1, C4, C5 et C6), et ce jusqu'au vingtième jour (D20) ; alors que dans 2 populations sur 6 COEV (C2 et C3) nous avons observé une extinction des virus entre D11 et D12. La coexistence des bactéries *E. coli* et des bactériophages PhiX174 est donc possible et peut durer au-delà de D20. Nous avons rapidement remarqué l'émergence de bactéries résistantes dans la population C1. Cette résistance et l'infectivité des virus ayant évolué au cours des 20 jours de l'expérimentation, nous en avons conclu qu'une coévolution dynamique s'établissait entre les deux protagonistes.

b. Séquençage des virus du jour 20

Nous avons séquencé des virus récupérés à D20 que nous avions auparavant isolés (plage de lyse unique) sur l'hôte ancestral. Nous en avons choisi 4 ayant subi le protocole DIREV (E2, E4, E5 et E6), deux de COEV (C1 et C6), et un ancestral (Anc). Nous avons analysé les mutations accumulées au cours des deux traitements. Nous avons trouvé 25 substitutions différentes pour 41 événements de mutations. Quatre-vingt pour cent des mutations ont été uniquement observées sur des virus DIREV ou COEV, et 20% à la fois sur des virus DIREV et COEV. Vingt-huit pour cent des mutations sont apparus en parallèle sur différentes lignées, et 24% des mutations avaient déjà été décrites dans la littérature (protocoles d'adaptation à un changement d'hôte et d'accumulation de mutations compensatoires (29, 39, 97, 124)). Quatre-vingt quatre pour cent des mutations étaient localisées dans les gènes de capsides. Les virus issus du traitement « contrôle » DIREV, ont accumulé en moyenne 6,25 mutations par génome, lesquelles étaient principalement localisées dans le gène *F* (77%). Les virus issus du traitement de coévolution continue COEV, ont eux accumulés en moyenne 8 mutations par génome, elles aussi principalement situées

dans le gène *F* (75%). Le rapport entre le nombre de mutations non-synonymes sur synonymes était respectivement de 1,78 et de 1,5 pour les virus DIREV et COEV, ce qui suggère que l'évolution est adaptative en cohérence avec la durée de l'expérimentation.

Nous nous attendions à avoir une différence plus importante entre le taux d'évolution des virus de DIREV et ceux de COEV. Nous nous sommes demandé quels facteurs auraient pu diminuer ou contraindre ce taux d'évolution des virus en coévolution. Nous avons comparé la taille de la population virale et la productivité des virus ayant coévolué de façon continue avec les bactéries.

c. Taille de la population virale et productivité

Si la taille de la population virale est moins importante avec le protocole COEV, alors cela pourrait expliquer, du moins en partie, que les virus n'aient pas un taux d'évolution si important par rapport aux virus DIREV. En effet, plus la taille de la population est importante et plus la probabilité d'émergence de mutations sélectionnables est importante. De même, si la productivité ou si la virulence des bactériophages COEV est diminuée par rapport à DIREV, alors la pression de sélection d'origine virale s'est sûrement amoindrie diminuant d'autant la dynamique de la coévolution, et cela se traduirait par la non augmentation du taux d'évolution de ces virus.

Nous avons en effet constaté que la concentration des virus dans les populations COEV était significativement légèrement moins importante que dans les populations DIREV. De même nous avons observé que la virulence des virus DIREV et COEV était diminuée par rapport au virus ancestral sur l'hôte ancestral. Enfin, la productivité des virus COEV est significativement plus faible que celle des virus DIREV, elle-même diminuée par rapport à la productivité du virus ancestral sur l'hôte ancestral.

d. Un compromis entre infectivité et productivité

Cette baisse de la productivité et de la virulence sur l'hôte ancestral, ainsi que la plus faible concentration virale dans les populations qui suivent le protocole COEV, sont autant de facteurs qui diminuent la pression de sélection d'origine virale agissant sur les bactéries en coévolution. Il semblerait qu'un compromis entre infectivité et virulence/productivité contraigne l'évolution des bactériophages. En effet, la population virale à D20 peut infecter certaines bactéries sensibles du bouillon de culture, alors que ces mêmes clones bactériens

sont résistants au phage ancestral. L'augmentation du spectre d'hôte se serait faite au détriment de la virulence et de la productivité (sur l'hôte ancestral).

e. Stabilité du système biologique en coévolution

Dans les études expérimentales publiées, on justifie souvent l'équilibre entre les bactéries résistantes et les bactéries sensibles, par le coût phénotypique qui serait associée à la résistance. Ici, nous n'avons pas mesuré de différence systématique du taux de croissance des clones bactériens sensibles par rapport aux résistants (en comparant la D.O à 24h).

Nous avons inoculé des clones bactériens (sensibles et résistants), isolés à D1, D10 et D20, à partir des populations C1, C2 et C3. Nous avons observé que les bactéries en coévolution continue avec les bactériophages subissent un fardeau, qui disparaît avec l'extinction des phages dans la population. Les bactéries de la population C1 poussent en effet toutes moins bien que les bactéries isolées à partir des populations C2 et C3 à D20, c'est-à-dire quand les phages avaient disparus de leur population. Ainsi, ce ne serait pas tant le fait de résister qui serait associé à un coût phénotypique, mais le simple fait d'être en coévolution continue avec les bactériophages.

Si l'absence de coût phénotypique associée à la résistance est vérifiée, alors ici ce pourrait être la diminution de la pression de sélection d'origine virale qui expliquerait la stabilité du système en coévolution.

f. Analyse critique du protocole

Il faut noter toutefois que le protocole « contrôle » choisi n'est pas le plus pertinent. En effet, bien que la population bactérienne soit renouvelée chaque jour, il se peut (et il est même fortement probable) que des mutants de résistance aient émergés, et que les virus ne soient donc pas confrontés à une population génétiquement homogène. Il aurait fallu opter pour des cycles de coévolution plus courts pour éviter cela. En choisissant des cycles de coévolution de 4h, nous aurions aussi amélioré le protocole de coévolution continue. En effet, les populations bactériennes récupérées au bout de 24h, c'est-à-dire au moment des transferts, sont en phase stationnaire. Il a été montré (cf. p-26) que les virus infectent préférentiellement les bactéries en phase exponentielle. Ainsi, il se peut que la coévolution ne se fasse que dans les premières heures suivant les transferts quotidiens, et non pas de façon continue comme nous l'aurions souhaité.

4. Discussion et observations complémentaires

a. Les virus de la population E4

Nous avons remarqué que les virus de la population E4 (du protocole « contrôle », COEV) sont ceux qui ont accumulé le moins de mutations (seulement 3, toutes dans le gène *F*). Il est intéressant de voir que ces virus ont une virulence très proche de celle du virus ancestral, mais une productivité sur ce même hôte ancestral réduite (plages de lyse 4 fois moins étendues). Cela suggère que les 3 mutations accumulées modifient plus drastiquement la productivité (en phase solide) que la virulence (en phase liquide). Nous pourrions envisager d'introduire par mutagenèse dirigée ces trois mutations pour mesurer précisément leur impact sur la valeur sélective de PhiX174.

b. Extinction des virus dans les populations C2 et C3

Est-ce que le fait qu'on ait observé une baisse de la productivité sur l'hôte ancestral, ainsi que le fait d'avoir choisi des « forts » goulots d'étranglement lors des transferts quotidiens, pourraient expliquer que les virus se soient éteints dans les populations C2 et C3 ? La proportion des populations virales qui s'éteignent pourrait-elle être une mesure des contraintes génétiques agissant sur l'évolution de PhiX174 ? Sans doute devons-nous ajouter une part de stochasticité, il n'empêche qu'il pourrait être intéressant de lancer un plus grand nombre de populations bactéries - bactériophages en coévolution pour voir si l'extinction de certaines populations virales s'accélère avec le temps ce qui indiquerait que le système est de plus en plus contraint.

Dans les deux populations, C2 et C3, où les virus ont disparus entre le D11 et le D12, on aurait pu s'attendre à ce que des bactéries sensibles ré-émergent dans la population. Cependant 100% des bactéries isolées à D20 étaient encore résistantes au phage ancestral. L'hypothèse d'un coût associé à la résistance aurait ainsi été appuyée. Notons toutefois que la non-réémergence des bactéries sensibles avait déjà été observée après la coévolution entre *E. coli* B et le phage T4 (76). Des mutations compensatoires avaient émergées pour contrebalancer les effets délétères associés à la résistance.

c. Critique du protocole de mesure de titration sur l'hôte ancestral.

Pour pouvoir titrer les populations virales à chaque génération, nous avons confronté les bouillons de culture à l'hôte ancestral. Nous avons observé de la lyse à toutes les générations dans les populations E1 à E6, C1, et C4 à C6, et nous avons fait l'hypothèse que dans les populations C2 et C3 nous n'avions plus de virus. Or, nous aurions pu considérer que les virus puissent perdre en infectivité sur l'hôte ancestral.

De plus, la titration des virus a été faite en phase solide (sur des tapis d'agare contenant l'hôte), alors que la coévolution s'est faite en milieu liquide. Il se pourrait que l'infectivité des virus en phase liquide ait évolué différemment de l'infectivité des virus en phase solide.

Enfin, nous avons établi que la virulence et productivité des bactériophages ayant subi le protocole COEV avait diminué par rapport au virus ancestral, et plus drastiquement que les virus DIREV, en confrontant ces virus à l'hôte ancestral. Nous n'avons pas mesuré la virulence/productivité « absolue » de ces virus, face aux clones bactériens contemporains puisqu'ils avaient eux-mêmes eu une histoire évolutive différente d'un traitement à l'autre.

5. Conclusion

Par cette étude, nous avons montré que l'équilibre qui s'établit entre les bactéries résistantes, les bactéries sensibles et les bactériophages peut ne pas uniquement dépendre des coûts phénotypiques associés à la résistance, mais peut aussi être expliqué par la diminution de la pression de sélection d'origine virale sur la population bactérienne due à l'atténuation de la virulence des virus. Un compromis entre virulence et infectivité pourrait être expliqué par les fortes relations d'épistasie existant entre les gènes d'interaction bactérie-bactériophage, ce dont nous allons discuter dans la prochaine partie du manuscrit.

DISCUSSION

I. Contraintes génétiques limitant la coévolution antagoniste entre *E. coli* et PhiX174

Nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, les bactéries et les bactériophages sont ubiquitaires et l'évolution de leur population est étroitement liée. Leur coexistence reposant en partie sur la coévolution antagoniste qui s'établit entre eux.

L'adaptation des bactéries aux bactériophages (et inversement) dépend d'une part de la possibilité qu'ils ont d'évoluer et d'autre part de la pression de sélection induite par les phages infectieux sur les bactéries sensibles, et de celle induite par les bactéries résistantes sur les phages. Plus la probabilité de rencontre entre les bactéries sensibles et les bactériophages infectieux, est importante et plus la pression de sélection favorise l'émergence de mutants bactériens évitant ou résistant à l'infection. *A contrario*, plus la probabilité de rencontre entre les phages et les bactéries résistantes est importante et plus la pression de sélection favorise l'émergence de mutants viraux contournant la résistance. La pérennité et le dynamisme de la coévolution antagoniste dépend donc de l'émergence des mutations (de résistance chez les bactéries et de plus grande infectivité chez les bactériophages) et de la propagation des nouveaux génotypes dans la population. Ces deux variables sont influencées par des paramètres écologiques, dynamiques et aussi génétiques.

Nous nous sommes mis, à chaque fois, dans des conditions expérimentales telles que la migration d'une population à l'autre soit nulle et l'agitation constante dans les bouillons de culture. Nous avons vu que ces paramètres bouleversent le cours de la coévolution, et nous avons voulu nous en affranchir. De même, nous avons utilisé le même milieu (1/4X LC) dans les différentes expérimentations. Nous n'étudierons donc pas l'influence de ces facteurs écologiques (migration, structuration de l'espace, et richesse du milieu). Nous discuterons dans un premier temps de l'impact des relations entre les gènes participant à l'interaction bactérie - bactériophage sur l'émergence des mutations au cours de la coévolution antagoniste entre *E. coli* et PhiX174. Puis nous verrons brièvement comment les variables dynamiques (taux de mutation et taille de la population) modifient elles aussi l'émergence et la propagation de ces mutations.

Nous allons utiliser le formalisme d'un réseau en 2D correspondant au « réseau des mutations possibles ». Nous ne représenterons ici que celui des bactéries : les génotypes sensibles sont symbolisés des ronds, les résistants pouvant être contournés par les phages par des carrés, et les résistants absolus par des étoiles. Les mutations sont représentées par des traits reliant les génotypes ; ces traits sont d'autant plus épais que la probabilité d'émergence des génotypes est importante. Les génotypes associés à une même valeur sélective, mesurée en absence de phages, sont coloriés d'une même couleur, l'ancêtre est au centre. La structure de ce réseau donnant une idée de la diversité « absolue » des populations, et des différents chemins évolutifs possibles ; n'apparaît pas sur ce réseau la distribution en fréquence des différents génotypes.

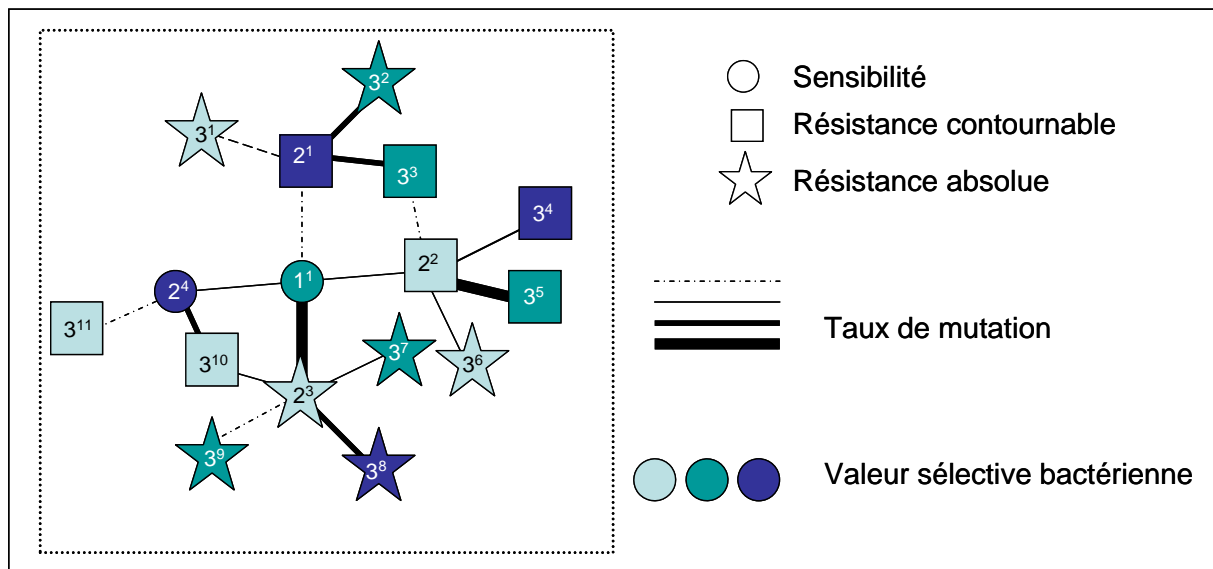


Figure 15 : Le « réseau des mutations possibles » bactérien.

Les bactéries de phénotype sensibles sont représentées par des ronds, les résistantes contournables par les bactériophages par des carrés, et les résistantes absolues par des étoiles. Le clone bactérien fondateur est représenté au centre.

L'épaisseur du trait correspond au taux de mutation (émergence du génotype).

Code couleur : **bleu clair** : valeur sélective faible, **bleu moyen** : valeur sélective moyenne, **bleu foncé** : haute valeur sélective.

1. Epistasie et structure des « réseaux des mutations possibles »

La pléiotropie des gènes, c'est-à-dire le fait qu'ils interviennent sur différents traits phénotypiques, fait que la mutation d'un gène peut avoir un impact sur différents caractères et peut altérer l'expression d'un autre gène ; c'est la notion d'épistasie. La valeur sélective de l'organisme est modifiée, ainsi que son potentiel évolutif. Considérons par exemple, le fait

qu'*E. coli* B résiste aux phages T en modifiant plus ou moins profondément les structures membranaires qui leur servent de récepteur. Les mutants résistants sont alors plus ou moins déstabilisés par la modification ou perte de fonctionnalité de ces structures, qui peuvent servir au métabolisme, à la pathogénicité, voir même au déplacement. La valeur sélective des mutants est plus ou moins diminuée par rapport à l'ancêtre, et il se peut que certaines mutations ne puissent plus émerger sans que ce soit létal pour la bactérie. En conclusion, l'émergence d'une mutation conditionne celle des mutations futures sur un même génotype (ainsi que leur propagation au sein d'une population comme nous le verrons par la suite).

Sur les « réseaux des mutations possibles » bactériens que nous avons représenté ci-après (Figure 16), différentes valeurs sélectives sont associées aux mutations conférant (ou non) aux bactéries une plus grande résistance aux phages.

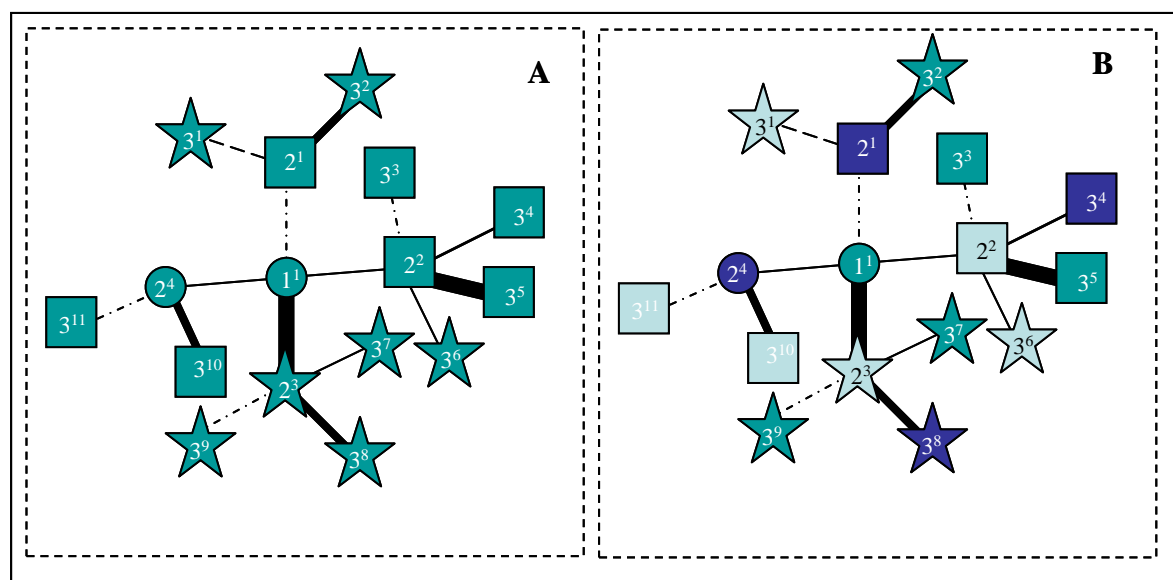


Figure 16 : Valeurs sélectives associées aux génotypes.

La légende de cette figure est celle déjà décrite pour la Figure 15.

Dans le « réseau «des mutations possibles» bactérien A (Figure 16), toutes les mutations qui émergent confèrent aux nouveaux génotypes une même valeur sélective. Toutes choses égales par ailleurs, la fréquence de chaque génotype dans la population est déterminée par la probabilité d'émergence des génotypes et le degré de résistance aux bactériophages associé. Dans le réseau B (Figure 16), les mutations sont associées à des valeurs sélectives différentes. La fréquence de chaque génotype est donc aussi fonction de cette valeur sélective. Ainsi sur le graphe A, vu la forte probabilité d'émergence du génotype 2³, et l'avantage adaptatif qu'il confère à la bactérie (résistance absolue) par rapport au génotype 2¹, il devrait

envahir la population et le chemin évolutif préférentiel devrait être celui qui en dérive. *A contrario*, sur le graphe **B** (Figure 16), le génotype 2^3 est associé à une très faible valeur sélective, alors que le génotype 2^1 , certes moins bien adapté à la présence des phages (résistance contournable), a une valeur sélective plus élevée. Dans un premier temps, le génotype 2^3 peut dominer dans la population, de part sa forte probabilité d'émergence, mais dans un second temps, le génotype 2^1 peut concurrencer le génotype 2^3 , voir même envahir la population.

Observation relative au système E. coli /PhiX174

Nous avons observé, lors de la coévolution continue entre *E. coli* C et PhiX174, qu'au premier jour de coévolution nous isolions exclusivement (100% dans la population C1, cf. p-98) des clones bactériens résistant au phage ancestral, ainsi qu'à toutes les générations des phages coévolus. C'est donc que la probabilité d'émergence de la résistance absolue est forte, et que ce trait phénotypique a été sélectionné, puisque ces mutants ont envahi les populations. Toutefois, au deuxième jour de la coévolution, nous n'avons plus isolé ces mutants mais plutôt des bactéries ne résistant qu'à certaines générations de virus coévolus (générations 1 à 3 et 13 à 20). Il semblerait donc que la valeur sélective associée à la résistante « absolue » ne permette pas aux bactéries du jour 1 de se maintenir dans la population (cf. génotype 2^3 versus 2^1 , Figure 16 **A** et **B**).

Sur la figure 15, seules les mutations qui ont une probabilité d'émerger, sont représentées sur ce « réseau des mutations possibles ». Les mutations létales n'apparaissent pas. Si nous les rendions apparentes, alors la structure du réseau des mutations pourrait ressembler aux graphes **C** ou **D** (Figure 17).

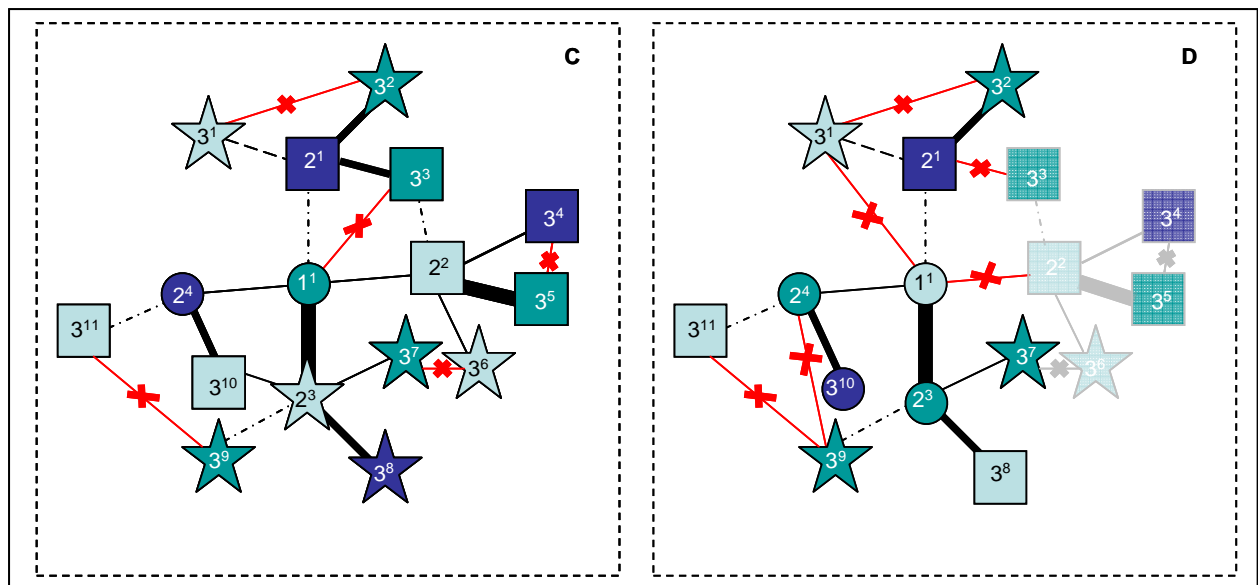


Figure 17 : Mutations létales et structure du « réseau des mutations possibles ».

La légende de cette figure est celle déjà décrite pour la Figure 15.

En rouge sont indiquées les mutations qui ne peuvent pas émerger (létales).

*Observation relative au système *E. coli* /PhiX174*

D'après les données de la littérature, nous savons que le double mutant $\Delta recC-\Delta rep$ est léthal. Or l'inactivation du gène *rep* confère une résistance absolue à *E. coli* C face à PhiX174. Si le génotype Δrep était représenté par le génotype 3^6 sur le graphe C (Figure 17), et si sur le graphe D (Figure 17) le clone bactérien ancestral est *E. coli* C- $\Delta recC$, alors nous pouvons concevoir que la mutation Δrep ne puisse plus émerger. Peut-être que de la même manière, la délétion du gène *rfaC* prévient l'inactivation de *rep*, et/ou toute autre mutation de résistance? Ce qui expliquerait que la coévolution antagoniste entre *E. coli* C- $\Delta rfaC$ et PhiX174 ait tourné court.

*Observation relative au système *E. coli* /PhiX174*

Nous l'avons vu dans l'introduction, la petite taille des génomes des bactériophages, et le fait que les gènes codent (presque) tous pour des fonctions essentielles à leur multiplication ajoute une contrainte génétique supplémentaire sur le nombre de mutations possibles. Nous avons observé que 20 % des mutations accumulées sur les génomes des virus coévolus avaient déjà été décrites dans la littérature, ce qui appuie cette hypothèse. En effet, le nombre

de mutations possibles pour les virus paraît être restreint, reste à vérifier si celui des bactéries est significativement plus important et s'il existe une corrélation entre la taille du génome et son évolutivité !

*Observation relative au système *E. coli* /PhiX174*

Nous avons établi, en étudiant le taux d'évolution des virus en coévolution continue avec les bactéries, qu'il existait un compromis entre virulence/productivité et infectivité chez PhiX174. C'est donc que les relations épistatiques fortes entre les gènes d'interaction bactérie-bactériophage l'empêchent d'optimiser ces deux paramètres en même temps.

L'épistasie entre les gènes participant à l'interaction bactérie – bactériophage serait fortement contraignante. Cela est sans doute dû au fait que ces gènes participent à des fonctions importantes pour la bactérie (métabolisme, réplication) et le phage (stabilité de la capsid, reconnaissance du récepteur). Le fait qu'une très faible valeur sélective puisse être associée aux mutations de résistance/infectivité peut avoir des conséquences drastiques sur le cours de la coévolution. En conséquence, il existerait un compromis entre le coefficient d'adaptation (intensité de la résistance/infectivité) et la valeur sélective des individus (nombre de descendant), puisque ces deux variables ne sont en effet pas forcément positivement corrélées. Cela favoriserait la co-existence de différents génotypes bactériens et viraux. La notion de coût associé à la résistance ou à l'infectivité semble globalement s'appliquer aux systèmes bactérie-bactériophage expérimentaux, et en particulier à notre système *E. coli* C / PhiX174. Cependant, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, elle n'est pas la règle et de nombreux contre exemples existent (ex. *E. coli* B/phage T5 ou *P. syringae* /Phi6), du moins dans les conditions de laboratoire.

Pour faire apparaître ces fortes relations d'épistasie, nous pourrions isoler et comparer les phénotypes de résistance/infectivité émergeant dans les différents génotypes ($\Delta rfaC$, $\Delta recC$, $\Delta slyD$...). Il faudrait pour cela, couler un tapis avec une forte densité de bactéries et virus, mettre à incuber et isoler le lendemain une à une les colonies bactériennes ayant poussé alors que l'ancêtre était sensible, ou les plages de lyse ayant percé alors que l'ancêtre était résistant. Cela peut aussi nous permettre de découvrir de nouvelles mutations avantageuses. Le même protocole peut-être appliqué sur des doubles mutants (ou triple...), et nous

pourrions alors savoir si les mêmes mutations apparaissent toujours dans les mêmes contextes génétiques et toujours dans le même ordre.

2. Modèles évolutifs et structure du « réseau des mutations possibles »

La force des relations épistatiques entre les gènes participant à l'interaction bactérie-bactériophage contraint la coévolution à suivre un modèle évolutif plutôt qu'un autre.

Dans le cas où le système biologique évoluerait selon un modèle « gène pour gène » (Figure 18, graphe **E**) alors à une mutation de résistance/infectivité donnée peut correspondre une infinité (ou du moins un certain nombre) de contre-mutations d'infectivité/résistance. Le maillage du « réseau des mutations possibles » est alors relativement serré ; plusieurs mutations pouvant émerger à partir de chaque génotype, et les mutations pouvant s'accumuler les unes aux autres. La diversité des phénotypes qui peuvent émerger assure une certaine réactivité à la population.

Si, au contraire, le système biologique évolue selon un modèle « aux allèles correspondants » (Figure 18, graphe **F**), alors à une mutation de résistance/infectivité donnée ne correspond qu'une (ou de très rares) contre-mutation(s) d'infectivité/résistance, selon un modèle clé/serrure et les mutations ne peuvent être cumulées. Dans ce cas, le « réseau des mutations possibles » est clairsemé ; quelques mutations pouvant émerger à partir de chaque génotype, mais sans qu'il y ait de changement de « stratégie » possible (résistance/infectivité par l'adsorption OU par la réplication OU par la lyse...). Quand un génotype envahit la population, c'est que la population bactérienne (ou phagique) se spécialise : cela détermine LE chemin évolutif que vont prendre les bactéries (et/ou les phages).

Le système hôte/parasite peut évoluer selon un modèle « gène pour gène », puis au fil de la coévolution, le nombre de mutations possibles peut diminuer jusqu'à correspondre à un modèle évolutif « aux allèles correspondants ».

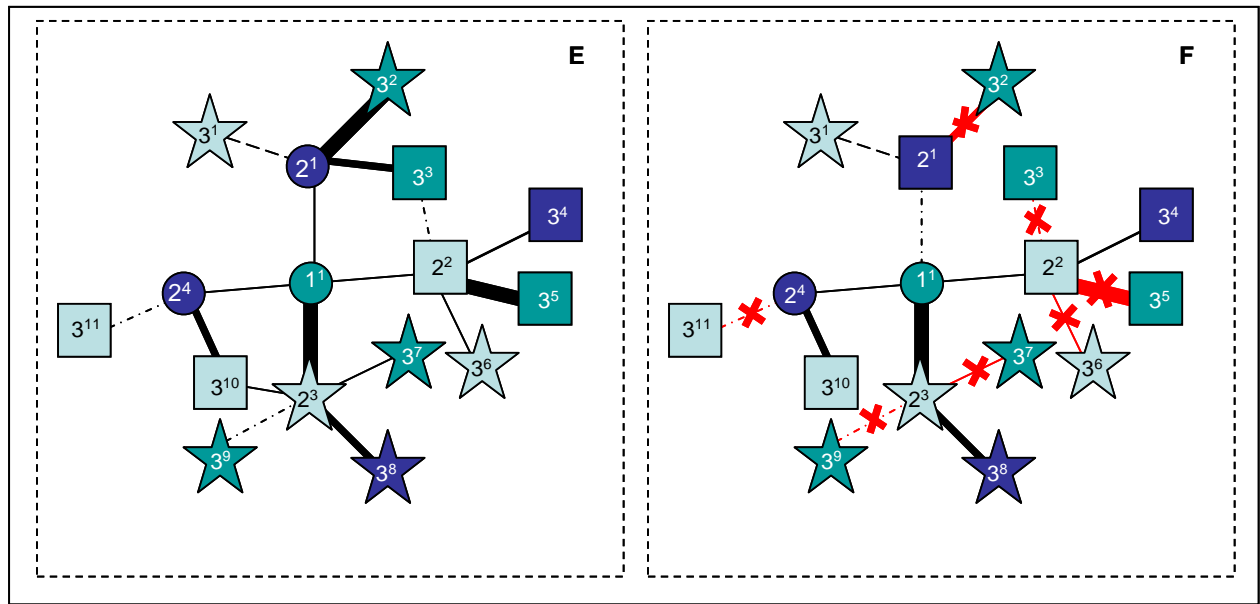


Figure 18 : Modèle évolutif et structure du « réseau des mutations possibles ».

La légende de cette figure est celle déjà décrite pour la Figure 15.

E : modèle « gène pour gène »

F : modèle « aux allèles correspondants ».

D'après les données de la littérature, plusieurs mutations d'*E. coli* C lui donnent une résistance contournable ou absolue à PhiX174, en bloquant l'infection au moment de l'adsorption ($\Delta rfaW$), de la réplication (Δrep) ou de la lyse ($\Delta slyD$). Cela sous-entend qu'au début de la coévolution ces différentes mutations peuvent émerger et conférer une résistance à large spectre à la population bactérienne, comme selon un modèle « gène pour gène ».

En étudiant le mécanisme de lyse induite par le gène E de PhiX174, on a trouvé que les mutants $\Delta slyD$ pouvaient lui résister, que les mutants PhiX174-Epos pouvaient contourner cette résistance, et que des bactéries mutées au niveau du gène essentiel *mraY* pouvaient à leur tour résister à ces virus-ci. Il est possible qu'en contraignant ainsi fortement la coévolution entre *E. coli* et PhiX174 on puisse restreindre les mutations émergentes et amener PhiX174 et *E. coli* à se spécialiser. De même, quand le gène *rep* est essentiel (contexte $\Delta recC$) les mutations ponctuelles de résistance dans ce gène peuvent amener phages et bactéries à se spécialiser. L'interaction pourrait alors évoluer selon un modèle « aux allèles correspondants ».

3. Propagation des génotypes mutés dans les populations

Dans une population homogène génétiquement, si deux mutations émergent en même temps chez deux individus différents, et avec une valeur sélective équivalente, alors ces deux mutations vont entrer en compétition ; c'est ce qui s'appelle l'interférence clonale. Les deux génotypes vont augmenter en fréquence dans la population, et co-exister jusqu'à ce qu'un événement extérieur les départage (émergence d'une seconde mutation avantageuse, le hasard de la distribution en génotypes au moment du goulot d'étranglement ...). Ce phénomène peut gêner la propagation de certaines mutations avantageuses et ainsi ralentir l'évolution des individus. Reprenons le graphe **E** (Figure 18), si 2^1 et 2^4 émergent en même temps, alors ces deux génotypes peuvent augmenter en fréquence de la même façon dans la population jusqu'à ce que quelque chose les départage. Comme l'émergence de la mutation 3^2 confère à la fois une forte valeur sélective et une résistance absolue au génotype 2^1 , alors elle peut permettre au génotype 2^1 d'envahir la population et faire disparaître le génotype 2^4 . Pour savoir si les conditions expérimentales de coévolution que nous avons choisies introduisent de l'interférence clonale, nous pourrions séquencer plus d'un génotype par population, et ce à plusieurs moments de la coévolution ; nous mesurerions ainsi l'homogénéité génétique de la population virale au cours de la coévolution et donc la compétition entre les génotypes.

4. Confrontation des « réseaux des mutations possibles »

En confrontant, à présent, les « réseaux des mutations possibles » bactériens et viraux nous pourrions avoir une idée de la dynamique de la coévolution qui s'établit entre les protagonistes. Si l'évolution de l'un des deux protagonistes est moins contrainte que celle de l'autre, alors la coévolution peut tourner à son avantage, et l'autre population peut s'éteindre.

*Observation relative au système *E. coli* /PhiX174*

Dans la première étude de ma thèse, nous avons trouvé que le noyau du LPS des souches sensibles pouvait être entier (comme *E. coli* C), modifié (comme *E. coli* K-12- $\Delta rfaB$) ou réduit à son strict minimum (comme *E. coli* K-12- $\Delta rfaC/D/E$, $\Delta lpcA$ ou $\Delta gmhB$). Cette reconnaissance des souches d'*E. coli* sensibles par PhiX174 serait donc relativement « souple » ; et dans cette optique, l'adsorption serait finalement « peu » contrainte. Il n'en est pas de même pour le potentiel coévolutif des bactéries. En effet, dans les systèmes expérimentaux décrits jusqu'à présent, les bactéries résistent aux bactériophages en modifiant

ou perdant leur récepteur. Ici, si l'on considère que le phage reconnaît un récepteur déjà réduit au strict minimum, alors la bactérie ne peut résister de la sorte. En effet, résister en modifiant le LPS ($\Delta rfaW$) n'a plus aucun sens, puisque le LPS est déjà totalement rogné.

On peut considérer que la relative « flexibilité » de la reconnaissance par PhiX174 est une contrainte qui altère le réseau des mutations possibles d'*E. coli* C.

Dans le système *E. coli* C/PhiX174 les deux protagonistes peuvent fortement contraindre l'évolution de l'autre. Ainsi la souplesse de la reconnaissance par PhiX174 de l'hôte conduit la bactérie à développer d'autres stratégies de résistance (ce qui n'a pas été décrit avec les autres systèmes expérimentaux), et les phénotypes de résistance variés pourraient contraindre PhiX174 à perdre en productivité

5. Réseaux des mutations possibles d'*E. coli* B et coévolution avec les phages T

Nous pouvons ajuster le formalisme du « réseau des mutations possibles » aux résultats qui ont été obtenus dans la littérature en faisant coévoluer *E. coli* B et les phages T. Il s'agit bien sûr ici, d'une illustration *a posteriori* (Figure 19).

Face au phage T2, *E. coli* B résiste dans un premier temps de façon partielle (phénotype représenté ici par un triangle), puis des mutants résistant totalement aux phages ont émergé (résistance contournable), et enfin des mutants de résistance absolue émergent dans la population.

Face au phage T4, des mutants d'*E. coli* B résistants émergent, et cette résistance n'est pas contournable par le phage. Le coût phénotypique est variable, et en absence de phages il s'estompe au fur et à mesure que des mutations compensatoires s'accumulent.

Face au phage T5, des mutants d'*E. coli* B résistants émergent, cette résistance n'est pas non plus contournable par le phage, et n'est associée à aucun coût phénotypique.

Enfin, face au phage T7, des mutants d'*E. coli* B résistants émergent, mais cette résistance est contournable. Dans un deuxième temps des mutants avec un phénotype de résistance absolue émergent.

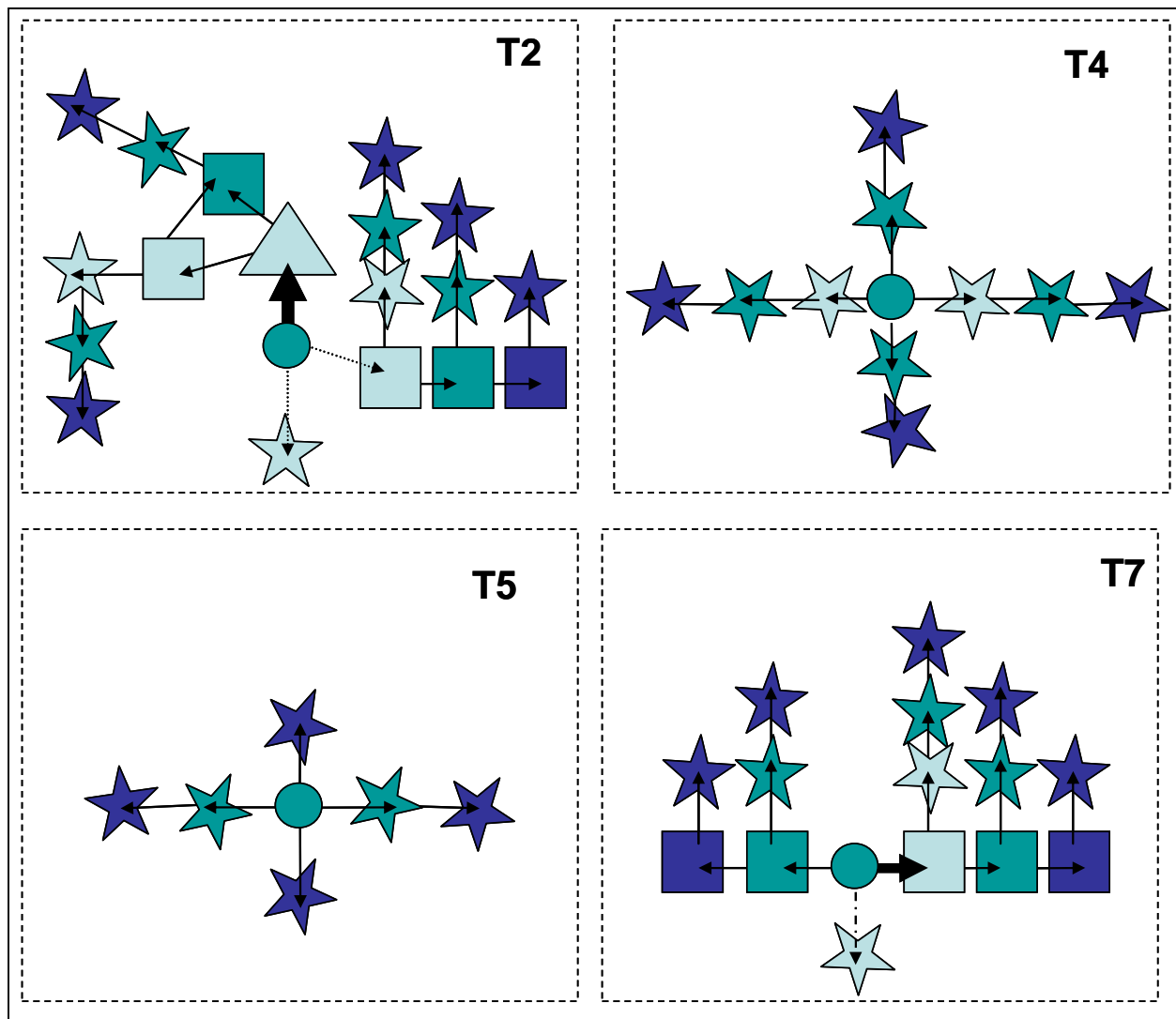


Figure 19 : « Réseau des mutations possibles » pour la coévolution entre *E. coli* B et les phages T.

La légende de cette figure est celle déjà décrite pour la Figure 15.

Le génotype représenté par un triangle correspondant à une résistance partielle.

Face aux phages T2, T4, et T7, un équilibre s'établit entre les phages, les bactéries sensibles et les bactéries résistantes, que la résistance soit contournable ou non. On peut expliquer cela par le coût associé aux mutations de résistance qui fait que les mutants sensibles sont plus compétitifs que les mutants résistants et donc se maintiennent dans la population. La compensation du coût de la résistance n'a été observée qu'en absence des phages et au bout d'une durée relativement longue (400 générations bactériennes).

6. Paramètres de dynamique des populations

Nous venons de décrire les « réseaux des mutations possibles », ces réseaux dessinent les « paysages adaptatifs » des populations bactériennes et virales. Ces paysages sont

« mouvants », ils se déforment quand ces populations sont en présence, et qu'elles doivent réagir à l'évolution de l'autre. Discutons rapidement des paramètres qui déterminent la vitesse de propagation des mutations à travers ces paysages.

Le nombre de mutations émergeant dans un temps donné est avant tout fonction du taux de mutation des individus. Ainsi un individu mutateur aura un nombre de mutations bien plus élevé qu'un individu avec un taux de mutation « classique ». A noter qu'ici le taux de mutation bactérien est imposé aux phages, en effet il correspond aux erreurs provoquées au moment de la duplication, PhiX174 dépendant entièrement de la machinerie cellulaire hôte, il ne peut les éviter. Nous l'avons vu, pendant la coévolution du système expérimental *P. fluorescens*- Phi2, le fait d'avoir un taux de mutation augmenté pouvait être sélectionné. Ici, nous n'avons pas mesuré le taux de mutation des bactéries coévoluées. Toutefois, Olivier Tenaillon avait observé que la coexistence entre *E. coli* C- Δ *mutT* et PhiX174 pouvait durer plus de 120 cycles (1200 générations bactériennes) (OT, communication personnelle). Nous pouvons donc supposer que le fait d'avoir un taux de mutation augmenté pourrait expliquer la pérennité de la coexistence bactérie – bactériophage.

D'autre part, pour un même taux de mutation, on observera d'autant plus de mutations que la population est nombreuse. Nous avons suivi l'évolution de la taille des populations bactériennes, au fil des différentes expérimentations, en mesurant la densité optique des bouillons de cultures avant chaque dilution d'un cycle de coévolution à l'autre. Nous avons ainsi pu montrer qu'avec *E. coli* C, la taille de la population bactérienne atteinte au bout de chaque cycle était relativement importante et constante, alors qu'avec le génotype *E. coli* C- Δ *recC* les populations bactériennes étaient bien moins denses (cf. p77). Cette différence de taille de population pourrait-elle expliquer, du moins en partie, le fait que la coévolution puisse durer avec le système *E. coli* C / PhiX174, et plus difficilement avec le système *E. coli*- Δ *recC*/PhiX174 ?

Enfin, le nombre de mutations possibles et observables est aussi fonction du temps de génération, et de la durée des cycles de dilution imposés. Ainsi, plus un individu se multiplie rapidement et plus on pourra observer les mutations émergentes, et ce d'autant plus quand la durée des cycles de coévolution est supérieure au temps de génération. Ici, le temps de génération des bactéries *E. coli* et des bactériophages PhiX174 est à peu près équivalent, de l'ordre de 20 minutes, et la durée des cycles de coévolution (entre deux dilutions) est toujours

la même, à savoir 24h. Nous l'avons vu, l'infection par les virus se fait préférentiellement pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne, et donc seulement pendant les premières heures après le co-ensemencement des bactéries et des bactériophages.

Nous n'avons pas mesuré le taux de recombinaison entre les bactéries en coévolution. De même, nous avons considéré que nous étions dans des conditions expérimentales telles que la recombinaison virale pouvait être négligée (COI inférieur ou égal à 1).

II. Pertinence du choix du système expérimental *E. coli* – PhiX174 et perspectives multiples

L'étude de la coévolution antagoniste bactéries / bactériophages, avec le système expérimental *E. coli* / PhiX174 nous a permis d'approfondir le concept de « contraintes génétiques ». D'autres notions d'écologie ou d'évolution peuvent encore être fouillées avec ce système-ci, comme par exemple l'avantage que pourrait représenter, pour les bactéries et/ou pour les phages, le fait de faire durer indéfiniment la coévolution ou encore l'impact des phages lysogènes sur la dynamique de coévolution entre une bactérie et un phage lytique.

De tels systèmes microbiologiques offrent, en effet, de nombreux avantages pour qui veut tester des prédictions théoriques en écologie ou évolution, et extrapoler ensuite à l'échelle d'organismes macroscopiques dits « plus complexes ». Nous l'avons vu, la petite taille des microorganismes, leurs temps de génération courts, ainsi que la grande taille de leurs populations facilitent les expérimentations à la fois sur une échelle spatiale et temporelle. De plus, les microorganismes sont facilement manipulables génétiquement. Enfin ils peuvent être stockés au froid en état d'activité suspendue pour être étudiés *post hoc*, ce qui permet de confronter différentes générations, de reproduire plusieurs fois de suite les mêmes expériences, et de tester la répétitivité de l'évolution. Les organismes les plus utilisés, sont souvent non-pathogènes, et très bien caractérisés génétiquement et physiologiquement (comme ici *E. coli* K-12 et PhiX174). Entre autre, l'étude des phages a permis de découvrir des mécanismes universels, comme la réplication, la recombinaison, la transcription, la traduction, la régulation des gènes etc... Les premiers génomes séquencés ont été ceux des phages (celui de PhiX174). Les enzymes de restriction ont été découvertes en étudiant l'infection des bactéries par les phages, et elles ont permis le développement qu'on connaît du clonage. Enfin certains phages sont aujourd'hui utilisés comme vecteurs de clonage.

Au-delà de ces découvertes fondamentales, l'étude de l'interaction entre les bactéries et les phages a aussi des applications très concrètes : en industrie, en écologie et en santé publique. Nous allons voir pourquoi il est nécessaire de comprendre les mécanismes de résistance des bactéries aux phages, et ce qui peut être fait avec le système expérimental *E. coli* – PhiX174.

1. Applications industrielles

De part leur spécificité d'hôte, certains phages permettent d'identifier, de détecter, et même de détruire certains germes bactériens indésirables en agro-industries. Bien que ces techniques ne soient encore qu'expérimentales, elles pourraient dans un avenir proche s'imposer (98).

a. Utiliser l'infectivité des phages pour identifier/détruire des bactéries

On peut classer les bactéries en fonction du type de pathologie engendré (pathotype), de leur sensibilité aux antibiotiques (antibiotype) ou encore de leurs caractéristiques antigéniques (sérotipe). De la même manière, il a été proposé d'utiliser leur résistance ou sensibilité à certains phages lytiques (lysotypie) pour les différencier. Au sein d'une même espèce bactérienne la lysotypie peut-être variable. Ce critère peut donc être très discriminant. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire a fait diminuer l'intérêt de la lysotypie, toutefois cette technique a l'avantage d'être très peu coûteuse (122).

Une fois que l'on a identifié une souche pathogène, on peut vouloir la tracer en utilisant un phage qui la lyse et qui lui est spécifique. Soit on quantifie l'amplification du phage dans le liquide à analyser. Soit on insère un gène rapporteur dans le génome du phage, et on mesure son expression qui sera fonction de la présence de la bactérie. Ces méthodes doivent toutefois être améliorées pour qu'elles soient appliquées en routine dans l'industrie agroalimentaire. Elles ont certains avantages (comme faire la distinction entre les cellules vivantes et mortes à faible coût), mais elles peuvent aussi donner des résultats faussement négatifs, si les cellules résistent aux phages utilisés (31).

Les phages peuvent être utilisés pour leur pouvoir lytique à différentes étapes en industrie alimentaire : pour prévenir ou limiter la colonisation des animaux vivants, pour décontaminer les carcasses de viandes, pour traiter les surfaces, ou pour traiter directement les aliments prêts à la consommation. Si leur utilisation n'est pas systématique aujourd'hui c'est notamment à cause de l'émergence de la résistance aux phages chez les bactéries cibles.

Nous avons établi que PhiX174 ne lyse que des souches d'*E. coli* « O-rough ». Comme les phages Br10, C21, FP1, FO, 6SR, il peut donc servir à différencier des souches « O-rough » entre elles. Vu la souplesse apparente de la reconnaissance de son récepteur, il pourrait être envisagé d'adapter PhiX174 à toutes les structures de LPS « rough » possibles,

afin d'obtenir une banque de virus qui permette de séparer rapidement, et à moindre coût, les bactéries *E. coli* « O-rough » des autres. Par ailleurs, le fait que toutes les souches sensibles à PhiX174 soient toutes d'origine humaine suggère que la sélection des souches « O-rough » dans les tubes digestifs humains puisse y être singulière. Il semblerait qu'aucune étude épidémiologique claire n'ait regardé la prévalence de souches « O-rough » dans différents contextes écologiques. L'utilisation de PhiX174 et des autres phages attaquant les « O-rough » permettrait dans un premier temps de mesurer la prévalence de ces souches.

Jusqu'à présent les souches d'*E. coli* « O-rough » n'ont pas été associées à une pathogénicité particulière, il n'est peut-être pas pertinent de vouloir les détruire de façon spécifique. Toutefois, si jamais l'étude de leur prévalence indiquait une quelconque association avec certains pathogènes, nous pourrions essayer d'utiliser ces virus spécifiques des « O-rough » pour s'en débarrasser.

b. Maîtriser la résistance des bactéries aux phages

Aujourd'hui, alors que l'on améliore les protocoles de détection et destruction des bactéries pathogènes en misant sur les phages, ceux-ci sont surtout connus pour être une menace dans l'industrie alimentaire. En effet, ils infectent de nombreuses bactéries couramment utilisées en fermentation industrielle (*Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Streptococcus thermophilus*...). La contamination par un phage des fermenteurs peut conduire à de lourdes pertes.

C'est pourquoi, des méthodes simples permettent de détecter les espèces virales dans ces fermenteurs (PCR, et anticorps) pour y répondre rapidement. Les industriels limitent au maximum les contaminations virales en changeant régulièrement les souches bactériennes, ou encore en utilisant des souches résistantes. Les souches de fermentation ont souvent plusieurs plasmides porteurs de gènes de résistances aux bactériophages. Plus de quarante plasmides ont été décrits, certains sont conjugatifs et donc transférables à des souches sensibles pour les rendre résistantes (31). Cependant les souches résistantes bien souvent perdent en efficacité de fermentation, et les virus évoluent et contournent ces résistances. L'importance de ce problème en industrie alimentaire, notamment laitière, a permis d'accumuler de nombreuses données sur l'interaction des phages avec leurs hôtes qui sont d'un grand intérêt en écologie. C'est en étudiant la résistance des souches de *Streptococcus thermophilus* que Horvath et coll. ont découvert le mécanisme de résistance bactérienne lié à la structure CRISPR (13).

PhiX174 étant un phage à ADN simple brin, il semblerait que le mécanisme de résistance par ajout de séquence virale dans la structure CRISPR ne soit pas adéquat. Toutefois, il pourrait être intéressant de suivre l'évolution de cette structure si l'on envisage d'étudier la coévolution antagoniste qui s'établirait entre *E. coli*, un prophage et PhiX174.

2. Applications écologiques

Nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, que l'impact des populations phagiques sur les populations bactériennes est fondamental. Or, comprendre la structure et la dynamique des populations bactériennes (et phagiques) est primordial, puisque les microorganismes participent au fonctionnement d'un écosystème : la façon dont il évolue et répond à un changement de l'environnement.

D'un point de vue écologique toujours, afin de prévenir un risque d'infection (bactérienne ou virale) via les eaux de consommation et de récréation, il convient d'identifier et de quantifier rapidement les microorganismes pathogènes. Il a été proposé de rechercher leur génome, mais cette méthode est biaisée puisque les génomes persistent plus longtemps dans les eaux que les organismes eux-mêmes et qu'il faudrait construire des amorces pour chacun des virus recherchés. On a étudié, du coup, la possibilité d'utiliser des microorganismes indicateurs modèles pour tracer les contaminants. La présence de tel ou tel virus, ceux spécifiques des entérobactéries par exemple, laisse supposer ici une pollution fécale (animale ou humaine). En recherchant ces virus modèles, on peut aussi mesurer l'efficacité d'un traitement (chlore, UVs...) sur la population virale en générale. Plusieurs types de virus sont utilisés dans ce but, les virus coliphage somatiques (dont PhiX174), les F-spécifiques, et ceux lysant *Bacteroides fragilis*. Ils ont chacun des avantages et des inconvénients qui font qu'aujourd'hui c'est la combinaison de ces différents suivis qui semble être de mise (23, 60, 61).

3. Applications en santé publique

a. La phagothérapie

Alors qu'il travaillait sur les phages, Félix d'Hérelle émit l'hypothèse qu'il fallait en être porteur pour guérir de dysenterie (24). Un sujet s'améliorant cliniquement parce que dans son intestin, le phage est présent et exprime une activité lytique à l'encontre des bactéries, ce qui entraîne sa guérison. Les sujets propagent ensuite les phages autour d'eux et l'épidémie

s'éteint. Il proposa donc d'administrer par voie orale des phages, ce qui a été fait pour la première fois en 1921, à l'hôpital des Enfants-Malades de Paris, chez des patients atteints de dysenterie (*Shigella*). Leur état s'améliora dès 24h après le traitement. En 1927, Félix d'Hérelle traita 74 malades de cholera asiatiques, et obtient un taux de mortalité de 8% (contre 63% de mortalité chez les patients contrôles) (110).

Dans les années 30, « le laboratoire du bactériophage », à Paris, ainsi que d'autres instituts de part le monde (Inde, Géorgie) ont été créés pour commercialiser des préparations de phages dirigées contre les maladies infectieuses courantes (sinusites, infections de blessures, et infections intestinales). On constate cependant que de très nombreuses solutions de phages manquent d'efficacité (44). En effet, pour éviter la contamination par des bactéries des solutions commercialisées, les industriels pouvaient ajouter des solutés qui ne permettaient pas toujours l'inactivation des toxines bactériennes et qui parfois rendaient inactifs les phages, ce qui du coup aggravait le cas des malades. De plus, ils étaient parfois utilisés contre des bactéries non-sensibles, ou en traitement de maladies non bactériennes. (24). Toutes ces difficultés rencontrées par la phagothérapie, ainsi que l'avènement des antibiotiques après la deuxième guerre mondiale, ont fait que l'utilisation des phages en thérapeutique a été abandonnée dans le monde occidental, mais a continué d'être développée dans les pays de l'Europe de l'Est.

A l'hôpital d'état de Tbilissi en Géorgie, on a traité et on traite encore des patients à l'aide de la phagothérapie. Non seulement pour soigner les maladies bénignes de l'enfant (otite, angine...), mais aussi pour soulager des malades porteur d'infections locales sévères (grands brûlés, infections aux staphylocoques au niveau d'une plaie de jambe, plaies à l'estomac...) induites par des bactéries parfois multirésistantes. Dans ces derniers cas, il semblerait que la phagothérapie soit le traitement de dernier recours, quand toutes les antibiothérapies ont échouées (79). Les phages sont récupérés dans les eaux du fleuve qui passe à proximité de l'hôpital ; leur pouvoir lytique est testé au contact des germes isolés chez le patient afin d'assurer l'efficacité du traitement. Plusieurs injections au niveau de la plaie infectée peuvent être nécessaires, de même plusieurs combinaisons de phages peuvent être administrées pour venir à bout des bactéries résistantes. Les patients viennent des Etats-Unis pour s'y faire soigner parce que l'efficacité de ces protocoles n'est pas encore officiellement reconnue par la Food and Drug Administration (FDA). En effet, pendant près de 80 ans, les

états de l'ex-union soviétique, n'ont pas fait les études épidémiologiques et les statistiques nécessaires pour valider la phagothérapie selon les critères occidentaux.

Aujourd'hui, alors que les antibiotiques ont été très largement utilisés, la prévalence des souches qui leur résistent ne cesse d'augmenter, ce qui est un gros problème de santé publique. Les limites de l'antibiothérapie font qu'on se tourne à nouveau vers la phagothérapie, avec le plus de prudence possible, c'est-à-dire en étudiant les risques liés à l'administration de cocktail de virus, et à l'émergence de la résistance aux virus chez les bactéries.

Certaines personnes au laboratoire maîtrisent les modèles murins d'infections urinaires et septicémie, et nous avons isolé une bactérie sensible à PhiX174, *E. coli* ROAR 340, qui appartient au sous-groupe phylogénétique B2₃ de l'espèce *E. coli*. Or ce groupe est significativement associé à des souches pathogènes (90% des B2 entraînent la mort des animaux dans un modèle de septicémie). Nous pourrions donc envisager de mettre en place, au laboratoire, un modèle de phagothérapie. Nous inoculerions *E. coli* ROAR340 à des souris par injection systémique ; et nous étudierions l'efficacité d'un traitement à base de PhiX174. On pourrait, par exemple, comparer l'efficacité d'un phage naïf par rapport à un phage issu d'une coévolution ; lequel serait capable de contourner de nombreuses mutations de résistance. On pourrait aussi comparer l'efficacité d'un phage spécialisé sur l'hôte en question par rapport à un phage présentant un large spectre d'hôte.

b. Autres solutions thérapeutiques dérivées de l'étude des phages

Alors que l'on étudie encore les intérêts et les risques liés à la phagothérapie, il a été proposé de rechercher des enzymes phagiques (notamment des enzymes lytiques) qui pourraient être directement utilisées contre les bactéries pathogènes, avec une spécificité d'hôte équivalente à celle des phages d'où elles proviennent, et qui ne déstabiliseraient donc pas la flore commensale des patients (127, 129). Avec une approche plus systématique, il a également été suggéré d'étudier les enzymes bactériennes cibles des enzymes phagiques, qui bloquent la croissance bactérienne pour permettre la reproduction des phages, et rechercher ensuite des molécules qui miment ces enzymes phagiques et pourraient être de nouveaux antibiotiques (80).

Notons ici que l'enzyme E de PhiX174, qui permet la lyse de l'hôte, est déjà utilisée pour fabriquer des vaccins (92). L'expression contrôlée de son gène permettrait d'obtenir des « bactéries fantômes ». De ces bactéries il ne reste plus que la paroi non-dénaturée qui est reconnue par le système immunitaire.

CONCLUSION

L'interaction entre les bactéries et les bactériophages a un impact direct sur la diversité et la stabilité des écosystèmes. Il est nécessaire d'étudier la coévolution antagoniste qui s'établit entre eux pour comprendre, prévoir et maîtriser l'émergence de la résistance des bactéries aux bactériophages, et répondre ainsi aux besoins de l'industrie, de l'écologie et de la recherche en santé publique.

La coévolution antagoniste entre les bactéries et les bactériophages s'apparente majoritairement à une « course à l'armement ». Nous pouvons considérer qu'une mutation de résistance envahissant la population bactérienne, ou qu'une mutation contournant la résistance bactérienne qui envahit la population virale, sont autant de « batailles » remportées par les bactéries ou les phages. La coévolution s'arrête quand il y a extinction d'une des deux populations, mais elle peut aussi bien s'enliser et durer indéfiniment. Des facteurs environnementaux et d'autres propres à la dynamique des populations (richesse du milieu, migration) modifient la taille des armées en présence, la diversité de leurs armes. Nous avons discuté ici du fait que des facteurs génétiques pouvaient eux aussi avoir un impact majeur sur les stratégies développées par l'un ou l'autre des protagonistes.

En effet, il semblerait que la coévolution entre *E. coli* C et PhiX174 puisse être dynamique dans un premier temps, puis que les contraintes génétiques agissant sur le système réduise le choix des armes des deux protagonistes au fil du temps. Les fortes relations épistatiques entre les gènes participant à l'interaction bactérie-bactériophage, ainsi que la petite taille du génome de PhiX174, font naître des compromis entre résistance et valeur sélective bactérienne, et entre virulence et infectivité virale. Le système expérimental *E. coli* C – PhiX174 devrait permettre de mieux étudier encore la structure des réseaux des mutations possibles et de suivre la diversité génotypique des populations virales et bactériennes au fil du temps.

ANNEXE

Influence of host genotype on bacteria - bacteriophage coexistence *Escherichia coli* C and ϕ X174

Alix MICHEL, Olivier TENAILLON

INSERM U722 « Ecologie et évolution des microorganismes », Université Paris 7 et Faculté de Médecine Xavier Bichat, [website: http://www.bichat.inserm.fr/equipes/emi0339/u722.html](http://www.bichat.inserm.fr/equipes/emi0339/u722.html)

INTRODUCTION

Antagonist coevolution occurs when specific ecological conditions are gathered. Bacteria have to be sensitive to the phages, their emerging resistance and multiplication rate have to insure their persistence while the phages multiply, leading to the lysis of the cells.

We have tested some parameters that could influence the length of the coexistence period : the **bacterial genotype**, the initial **coefficient of infection**, and the size of the **bottle-neck** used in the daily transfers (only for one genotype).

By genetically modifying the bacteria, we can affect how further resistance can emerge, for instance favour the emergence of absolute resistance or forbid it.

MATERIEL AND METHODS

Genotypes

BACTERIAL STRAINS	Sensitivity to Φ X174	O.D (600nm) of KEIO mutant vs. reference	Infection step modified by the gene mutation	Comments
<i>E. coli</i> C (DSMZ13127)	Sensitive			
<i>E. coli</i> C- Δ rfaC	Sensitive	26%	Recognition	« Deep-rough » LPS : no more recognition mutations are possible.
<i>E. coli</i> C- Δ recC	Sensitive	58%	Replication	Can't mute <i>rep</i> providing absolute resistance since Δ recC- Δ rep is synthetic lethal ¹ .
<i>E. coli</i> C- Δ slyD	Partial resistance	67 %	Lysis	Mutants of Φ X174 lysing this resistant host have been described ² .

Broth ¼ X LC (diluted in MgSO₄ 10-2M), complemented with CaCl₂ 5mM and MgCl₂ 10mM, kanamycine 30µM (or not), with inoculation of ϕ X174 according to the COI.

COI (Coefficient of infection) **COI: 1, 10⁻³ or 10⁻⁶.**

Bottle-necks **1/1000** transferred daily (10µL/ 10mL) for each culture tube, plus **1/100** and **1/10** for Δ rfaC,

Daily O.D (600nm) was measured and lysis on *E. coli* C was checked.

RESULTS

Figure 1 : Coexistence of bacteria and phages within the culture tubes.

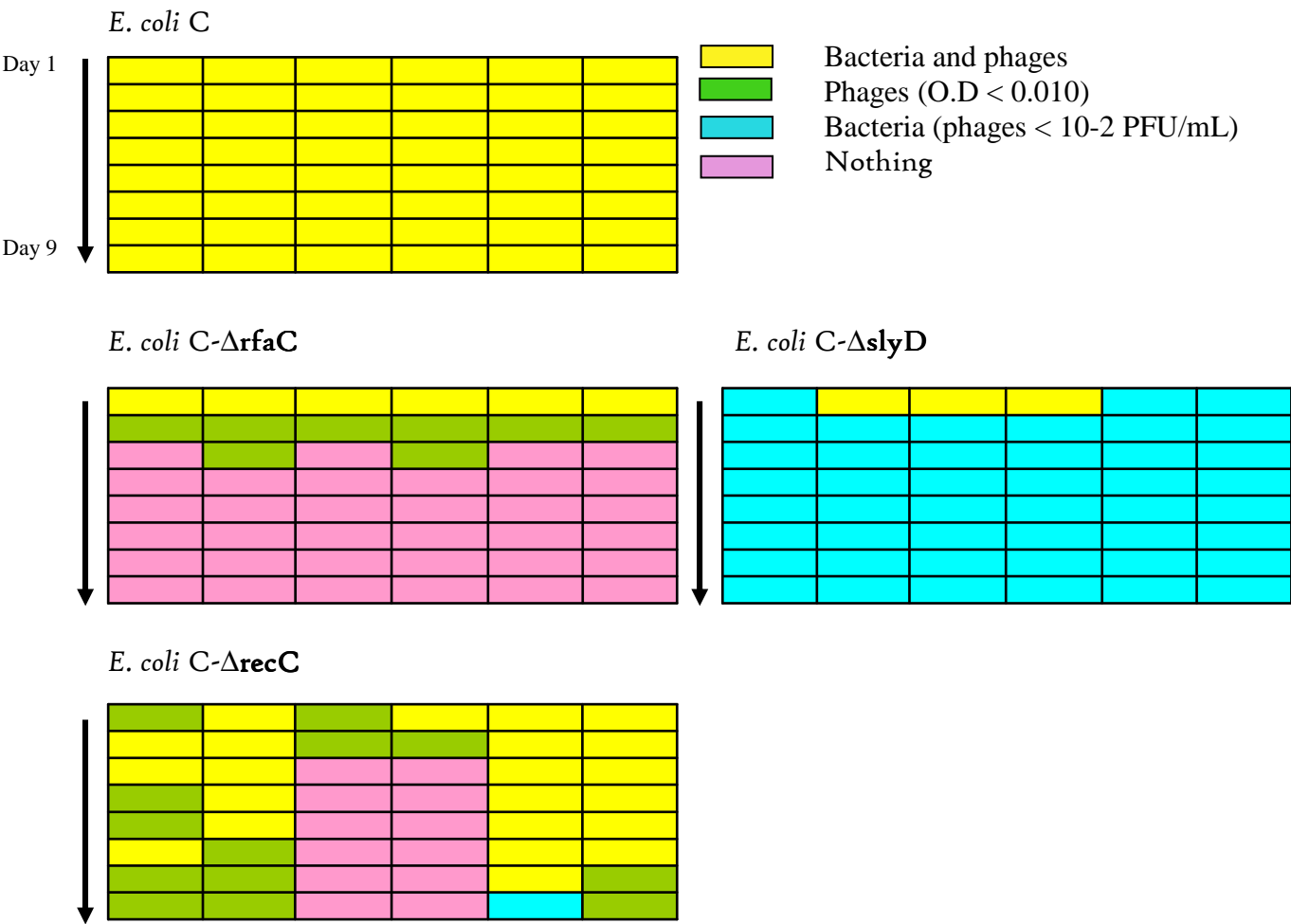
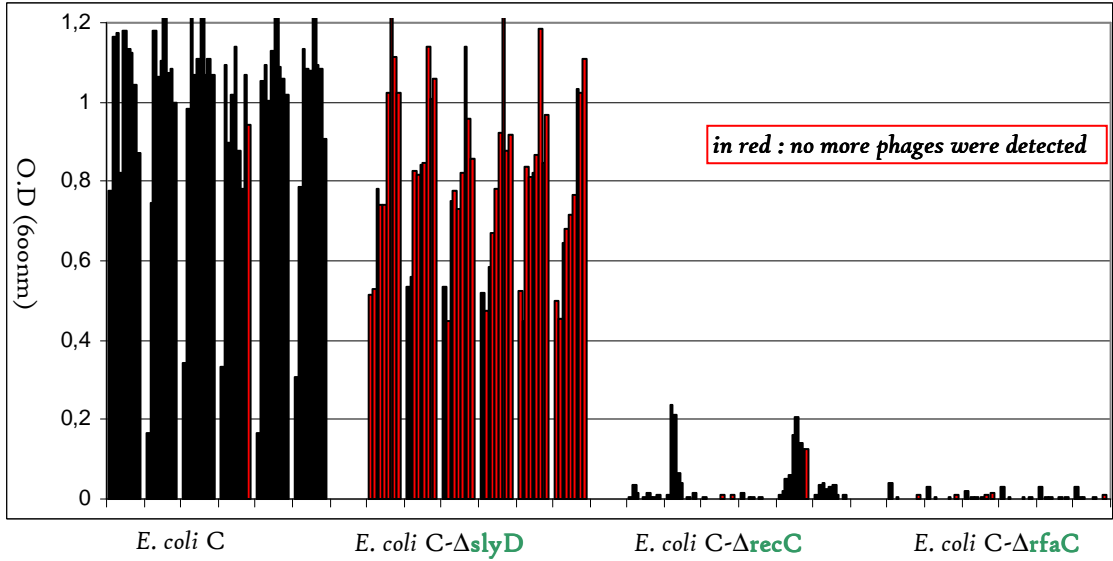


Figure 2 : Bacterial density in populations tubes.



<i>E. coli</i> C	Coexistence is observed from day 1 to day 9. Bacteria reach high O.D, even when phages are present.
<i>E. coli</i> C- Δ slyD	All phages had disappeared on day 2. Bacteria reach high O.D.
<i>E. coli</i> C- Δ recC	Coexistence has been observed within 4/6 populations tubes with different length period, and bacteria and viruses rapidly disappeared in 2/6 populations. Bacteria O.D varies from low to very low (to extinction).
<i>E. coli</i> C- Δ rfaC	No more bacteria nor phages were present from day 4. We observed no influence of the COI, and the bottle-neck size (1/100 and 1/10 with Δ rfaC) – data not shown here.

CONCLUSIONS

Depending on genotype, the *E.coli* C – PhiX74 coexistence can last from 1 day to more than 9 days.

With the resistant bacterial genotype *E. coli* C- Δ slyD, the viruses rapidly go to extinction. With the two sensitive genotypes *E. coli* C- Δ rfaC and *E. coli* C- Δ recC, we observed the extinction of bacteria logically followed by viral extinction. Coexistence is however longer in the case of *E. coli* C- Δ recC. In both cases the number of ways the bacteria could resist was reduced. It seems that this shifted the balance in favor of the phage that took over. Hence, bacterial initial genotype and the resistance alleles that could emerge of it has a major influence on bacteria – phage coexistence, even if we tried to correct for that in another experiment (not shown) a critical parameter could also be the growth rate of the bacteria that is affected by our genetic modifications.

This experience doesn't only indicate the best bacterial genotype that could coevolve with ϕ X174, it also highlights how resistance mutations abilities can contrive coevolution.

¹ - *Lethality of rep-recB and rep-recC double mutants E.coli*, M. Uzest et coll., Molecular Microbiology 1995, 17 (6) : 1177-1188

² - *Genetic evidence that the bacteriophage PhiX174 lysis protein inhibits cell wall synthesis*, T. G. Bernhardt et coll., PNAS 2000, 97 (8) : 4297-4302.

BIBLIOGRAPHIE

1. BACTERIOPHAGE M13 [EN LIGNE].
[HTTP://WWW.HAVERFORD.EDU/BIOLOGY/JOHNSON/M13.PNG](http://www.haverford.edu/biology/johnson/m13.png).
2. BACTERIOPHAGE MS2 [EN LIGNE].
[HTTP://WWW.NCBL.NLM.NIH.GOV/ICTVDB/WINTKEY/IMAGES/089-29.JPG](http://www.ncbl.nlm.nih.gov/ictvdb/wintkey/images/089-29.jpg).
3. BACTERIOPHAGE PHI6 [EN LIGNE].
[HTTP://WWW.NCBL.NLM.NIH.GOV/ICTVDB/WINTKEY/IMAGES/395-10.JPG](http://www.ncbl.nlm.nih.gov/ictvdb/wintkey/images/395-10.jpg).
4. BACTERIOPHAGE T4 [EN LIGNE]
[HTTPS://WWW.MSU.EDU/COURSE/LBS/333/FALL/IMAGES/T4 MICROGRAPH.GIF](https://www.msu.edu/course/lbs/333/fall/images/t4_micrograph.gif).
5. 1977. FULL GENE SEQUENCE OF DNA VIRUS SOLVED. SCIENCE NEWS OF THE WEEK 111:148-149.
6. ONERBA [EN LIGNE]. [WWW.ONERBA.ORG](http://www.onerba.org).
7. ABEDON, S. T. 2008. BACTERIOPHAGE ECOLOGY : POPULATION GROWTH, EVOLUTION, AND IMPACT OF BACTERIAL VIRUSES. ED. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS CHAP.11.2.3:288.
8. ABEDON, S. T. 2001. HOW BIG IS 1030? BACTERIOPHAGE ECOLOGY GROUP (BEG) NEWS 7.
9. AGRAWAL, A., AND C. M. LIVELY. 2002. INFECTION GENETICS: GENE-FOR-GENE VERSUS MATCHING-ALLELES MODELS AND ALL POINTS IN BETWEEN. EVOL. ECOL. RES. 4:79-90.
10. AMOR, K., D. E. HEINRICHS, E. FRIRDICH, K. ZIEBELL, R. P. JOHNSON, AND C. WHITFIELD. 2000. DISTRIBUTION OF CORE OLIGOSACCHARIDE TYPES IN LIPOPOLYSACCHARIDES FROM *ESCHERICHIA COLI*. INFECT. IMMUN. 68:1116-1124.

11. ANDERSSON, A. F., AND J. BANFIELD. 2008. VIRUS POPULATION DYNAMICS AND ACQUIRED VIRUS RESISTANCE IN NATURAL COMMUNITIES. *SCIENCE* 320:1047-1050.
12. ANGLY, F. E., B. FELTS, M. BREITBART, P. SALAMON, R. A. EDWARDS, C. CARLSON, A. M. CHAN, M. HAYNES, S. KELLEY, H. LIU, J. M. MAHAFFY, J. E. MUELLER, J. NULTON, R. OLSON, R. PARSONS, S. RAYHAWK, C. A. SHUTTLE, AND F. ROHWER. 2006. THE MARINE VIROMES OF FOUR OCEANIC REGIONS. *PLOS BIOL.* 4:E368.
13. BARRANGOU, R., C. FREMAUX, H. DEVEAU, M. RICHARDS, P. BOYAVAL, S. MOINEAU, D. A. ROMERO, AND P. HORVATH. 2007. CRISPR PROVIDES ACQUIRED RESISTANCE AGAINST VIRUSES IN PROKARYOTES. *SCIENCE* 315:1709-1712.
14. BAUER, M. E., AND R. A. WELCH. 1997. PLEIOTROPIC EFFECTS OF A MUTATION IN *RFAC* ON *ESCHERICHIA COLI* HEMOLYSIN. *INFECT. IMMUN.* 65:2218-2224.
15. BERCHE, P. 2007. UNE HISTOIRE DES MICROBES. ED. JOHN LIBBEY EUROTTEST.
16. BERNHARDT, T. G., W. D. ROOF, AND R. YOUNG. 2002. THE *ESCHERICHIA COLI* FKBP-TYPE PPLASE SLYD IS REQUIRED FOR STABILIZATION OF THE E LYSIS PROTEIN OF BACTERIOPHAGE PHIX174. *MOL. MICROBIOL.* 45:9-108.
17. BERNHARDT, T. G., W. D. ROOF, AND R. YOUNG. 2000. GENETIC EVIDENCE THAT THE BACTERIOPHAGE PHIX174 LYSIS PROTEIN INHIBITS CELL WALL SYNTHESIS. *PNAS* 97:4297-4302.
18. BIELKE, L., S. HIGGINS, A. DONOGHUE, D. DONOGHUE, AND B. M. HARGIS. 2007. *SALMONELLA* HOST RANGE OF BACTERIOPHAGES THAT INFECT MULTIPLE GENERA. *POULT. SCI.* 86:2536-2540.

19. BIZE, A., X. PENG, M. PROKOFEVA, K. MACLELLAN, S. LUCAS, P. FORTERRE, R. GARRETT, E. BONCH-OSMOLOVSKAYA, AND D. PRANGISHVILI. 2008. VIRUSES IN ACIDIC GEOTHERMAL ENVIRONMENTS OF THE KAMCHATKA PENINSULA. RES. MICROBIOL. 159:358-366.
20. BLATTNER, F. R., G. PLUNKETT III, C. A. BLOCH, N. T. PERNA, V. BURLAND, M. RILEY, J. COLLADO-VIDES, J. D. GLASNER, C. K. RODE, G. F. MAYHEW, J. GREGOR, N. W. DAVIS, H. A. KIRKPATRICK, M. A. GOEDEN, D. J. ROSE, B. MAU, AND Y. SHAO. 1997. THE COMPLETE GENOME SEQUENCE OF *ESCHERICHIA COLI* K-12. SCIENCE 277:1453-1462.
21. BOHANNAN, B. J. M., AND R. E. LENSKE. 2000. LINKING GENETIC CHANGE TO COMMUNITY EVOLUTION : INSIGHTS FROM STUDIES OF BACTERIA AND BACTERIOPHAGE. ECOL. LETT. 3:362-377.
22. BOHANNAN, B. J. M., AND R. E. LENSKE. 2000. THE RELATIVE IMPORTANCE OF COMPETITION AND PREDATION VARIES WITH PRODUCTIVITY IN A MODEL COMMUNITY. THE AM. NAT. 156:329-340.
23. BOSCH, A. 1998. HUMAN ENTERIC VIRUSES IN THE WATER ENVIRONMENT: A MINIREVIEW. INT. MICROBIOL. 1:191-196.
24. BRADBURY, J. 2004. "MY ENEMY'S ENEMY IS MY FRIEND" THE LANCET 363:624-625.
25. BREITBART, M., AND F. ROHWER. 2005. HERE A VIRUS, THERE A VIRUS, EVERYWHERE THE SAME VIRUS? TRENDS MICROBIOL. 13:278-284.
26. BROCKHURST, M. A., A. BUCKLING, V. POUILLAIN, AND M. E. HOCHBERG. 2007. THE IMPACT OF MIGRATION FROM PARASITE-FREE PATCHES ON ANTAGONIST HOST-PARASITE COEVOLUTION. EVOLUTION 61:1238-1243.

27. BROCKHURST, M. A., A. D. MORGAN, P. B. RAINEY, AND A. BUCKLING. 2003. POPULATION MIXING ACCELERATES COEVOLUTION. *ECOL. LETT.* 6:975-979.
28. BUCKLING, A., AND P. B. RAINEY. 2001. ANTAGONISTIC COEVOLUTION BETWEEN A BACTERIUM AND A BACTERIOPHAGE. *PROC. R. SOC. LOND. B* 269:931-936.
29. BULL, J. J., M. R. BADGETT, H. A. WICHMAN, J. P. HUELSENBECK, D. M. HILLIS, A. GULATI, C. HO, AND I. J. MOLINEUX. 1997. EXCEPTIONAL CONVERGENT EVOLUTION IN A VIRUS. *GENETICS* 147:1497-1507.
30. BURCH, A. D., AND B. A. FANE. 2000. FOREIGN AND CHIMERIC EXTERNAL SCAFFOLDING PROTEINS AS INHIBITORS OF MICROVIRIDAE MORPHOGENESIS. *J. VIROL.* 74:9347-9352.
31. CALLANAN, M. J., AND T. R. KLAENHAMMER. 2002. BACTERIOPHAGES IN INDUSTRY. *ENCYCLOPEDY OF LIFE SCIENCES*.
32. CARBONE, A. 2008. CODON BIAS IS A MAJOR FACTOR EXPLAINING PHAGE EVOLUTION IN TRANSLATIONALLY BIASED HOSTS. *J. MOL. EVOL.* 66:210-223.
33. CARTER, J., AND V. SAUNDERS. 2007. *VIROLOGY - PRINCIPLES AND APPLICATIONS*. ED. WILEY:219-255.
34. CHAO, L., B. R. LEVIN, AND F. M. STEWART. 1977. A COMPLEX COMMUNITY IN A SIMPLE HABITAT : AN EXPERIMENTAL STUDY WITH BACTERIA AND PHAGE. *ECOLOGY* 58:369-374.
35. CHIBANI-CHENNOUFI, S., A. BRUTTIN, M.-L. DILLMANN, AND H. BRUSSOW. 2004. PHAGE-HOST INTERACTION: AN ECOLOGICAL PERSPECTIVE. *J. BACTERIOL.* 186:3677-3686.
36. CLERMONT, O., S. BONACORSI, AND E. BINGEN. 2000. RAPID AND SIMPLE DETERMINATION OF THE *ESCHERICHIA COLI* PHYLOGENETIC GROUP. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 66:4555-4558.

37. CLERMONT, O., M. LESCAT, C. O'BRIEN, D. GORDON, O. TENAILLON, AND E. DENAMUR. 2008. EVIDENCE FOR A HUMAN-SPECIFIC *ESCHERICHIA COLI* CLONE. *ENVIRON. MICROBIOL.* 10:1000-1006.
38. CODERLY, L. C., WEI WEI, K. Y. SAMPSON, J. MILLSTEIN, H. A. WICHMAN, AND S. M. KRONE. 2009. SPACE, TIME, AND HOST EVOLUTION FACILITATES COEXISTENCE OF COMPETING BACTERIOPHAGES : THEORY AND EXPERIMENT. *AM. NAT.* 173:E121-E138.
39. CRILL, W. D., H. A. WICHMAN, AND J. J. BULL. 2000. EVOLUTIONARY REVERSALS DURING VIRAL ADAPTATION TO ALTERNATING HOSTS. *GENETICS* 154:27-37.
40. D'HERELLE, F. 1917. SUR UN MICROBE INVISIBLE ANTAGONISTE DES BACILLES DYSENTERIQUES. *CR ACAD SCIENCES, PARIS* 165:373-375.
41. DATSENKO, K. A., AND B. L. WANNER. 2000. ONE STEP INACTIVATION OF CHROMOSOMAL GENES IN *ESCHERICHIA COLI* K-12 USING PCR PRODUCTS. *PNAS* 97:6640-6645
42. DE PAEPE, M., AND F. TADDEI. 2006. VIRUSES' LIFE HISTORY: TOWARDS A MECHANISTIC BASIS OF A TRADE-OFF BETWEEN SURVIVAL AND REPRODUCTION AMONG PHAGES. *PLOS BIOL.* 4:1248-1256.
43. DECAESTECKER, E., S. GABA, J. A. M. RAEYMAEKERS, R. STOKS, L. VAN KERCKHOVEN, D. EBERT, AND L. DE MEESTER. 2007. HOST-PARASITE "RED QUEEN" DYNAMICS ARCHIVED IN POND SEDIMENT. *NATURE LETT.* 450:870-874.
44. DUBLANCHET, A. 2007. THE EPIC OF PHAGE THERAPY. *CAN. J. INFECT. DIS. MED. MICROBIOL.* 18:15-18.

45. DURIEZ, P., O. CLERMONT, S. BONACORSI, E. BINGEN, A. CHAVENTRÉ, J. ELION, B. PICARD, AND E. DENAMUR. 2001. COMMENSAL *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES ARE PHYLOGENETICALLY DISTRIBUTED AMONG GEOGRAPHICALLY DISTINCT HUMAN POPULATIONS. MICROBIOLOGY 147:1671-1676.
46. EDWARDS, R. A., AND F. ROHWER. 2005. VIRAL METAGENOMICS. NATURE REV. MICROBIOL. 3:504-510.
47. EKECHUKWU, M. C., D. J. OBERSTE, AND B. A. FANE. 1995. HOST AND PHIX174 MUTATIONS AFFECTING THE MORPHOGENESIS OR STABILIZATION OF THE 50S COMPLEX, A SINGLE-STRANDED DNA SYNTHESIS INTERMEDIATE. GENETICS 140:1167-1174.
48. ESCOBAR-PÁRAMO, P., K. GRENET, A. LE MENAC'H, L. RODE, E. SALGADO, C. AMORIN, S. GOURIOU, B. PICARD, M. C. RAHIMY, A. ANDREMONT, E. DENAMUR, AND R. RUIMY. 2004. LARGE-SCALE POPULATION STRUCTURE OF HUMAN COMMENSAL *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 70:5698.
49. ESCOBAR-PÁRAMO, P., A. LE MENAC'H, T. LE GALL, C. AMORIN, S. GOURIOU, B. PICARD, D. SKURNIK, AND E. DENAMUR. 2006. IDENTIFICATION OF FORCES SHAPING THE COMMENSAL *ESCHERICHIA COLI* GENETIC STRUCTURE BY COMPARING ANIMAL AND HUMAN ISOLATES. ENVIRON. MICROBIOL. 8:1975-1984.
50. EWERS, C., G. LI, H. WILKING, S. KIEBLING, K. ALT, E.-M. ANTÃO, C. LATURNUS, I. DIEHL, S. GLODDE, T. HOMEIER, U. BOHNKE, S. HARTMUT, H.-C. PHILIPP, AND L. H. WIELER. 2007. AVIAN PATHOGENIC, UROPATHOGENIC, AND NEW-BORN MENINGITIS-CAUSING *ESCHERICHIA COLI* : HOW CLOSELY RELATED ARE THEY ? INT. J. MED. MICROBIOL. 297:163-176.

51. FANE, B. A., K. L. BRENTLINGER, A. D. BURCH, M. CHEN, S. HAFENSTEIN, E. MOORE, C. R. NOVAK, AND A. UCHIYAMA. 2006. THE BACTERIOPHAGES. OXFORD UNIVERSITY PRESS EDITED BY CALENDAR R., ABEDON S. T.:129-145.
52. FEIGE, U., AND S. STIRM. 1976. ON THE STRUCTURE OF THE *ESCHERICHIA COLI* C CELL WALL LIPOPOLYSACCHARIDE CORE AND ITS PHIX174 RECEPTOR REGION. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 71:566-573.
53. FENTON, A., AND M. A. BROCKHURST. 2007. EPISTATIC INTERACTIONS ALTER DYNAMICS OF MULTILOCUS GENE FOR GENE COEVOLUTION. PLOS ONE E1156.
54. FORDE, S. E., R. E. BEARDMORE, I. GUDELJ, S. S. ARKIN, J. N. THOMPSON, AND L. D. HURST. 2008. UNDERSTANDING THE LIMITS TO GENERALIZABILITY OF EXPERIMENTAL EVOLUTIONARY MODELS. NATURE LETT. 455:220-224.
55. FORTERRE, P. 2006. THE ORIGIN OF VIRUSES AND THEIR POSSIBLE ROLES IN MAJOR EVOLUTIONARY TRANSITIONS. VIRUS RES. 117:5-16.
56. FROISSART, R., C. O. WILKE, R. MONTVILLE, S. K. REMOLD, L. CHAO, AND P. E. TURNER. 2004. CO-INFECTION WEAKENS SELECTION AGAINST EPISTATIC MUTATIONS IN RNA VIRUSES. GENETICS 168:9-19.
57. FRYDENDAHL, K. 2002. PREVALENCE OF SEROGROUPS AND VIRULENCE GENES IN *ESCHERICHIA COLI* ASSOCIATED WITH POSTWEANING DIARRHOEA AND EDEMA DISEASE IN PIGS AND A COMPARISON OF DIAGNOSTIC APPROACHES. 85:169-182.
58. FUHRMAN, J. A. 1999. MARINE VIRUSES AND THEIR BIOGEOCHEMICAL AND ECOLOGICAL EFFECTS. NATURE REV. 399:541- 548.

59. FUHRMAN, J. A., AND M. SCHWALBACH. 2003. VIRAL INFLUENCE ON AQUATIC BACTERIAL COMMUNITIES. BIOL. BULL. 204:192-195.
60. GANTZER, C., F. LUCENA, L. SCHWARTZBROD, AND J. JOFRE. 1998. INDICATORS OF VIRAL CONTAMINATION IN AQUATIC ENVIRONMENTS : MYTH OR REALITY? VIROLOGY 2:117-125.
61. GERBA, C. P. 2006. BACTERIOPHAGE AS POLLUTION INDICATORS. BACTERIOPHAGES, 2ND EDITION CHAP.45:695-701.
62. GUYADER, S., AND C. L. BURCH. 2008. OPTIMAL FORAGING PREDICTS THE ECOLOGY BUT NOT THE EVOLUTION OF HOST SPECIALIZATION IN BACTERIOPHAGES. PLOS ONE 3.
63. HENDRIX, R. W., M. C. M. SMITH, R. N. BURNS, M. E. FORD, AND G. F. HATFULL. 1999. EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS AMONG DIVERSE BACTERIOPHAGES AND PROPHAGES : ALL THE WORLD'S A PHAGE. PNAS 96:21922-2197.
64. IGUCHI, A., S. IYODA, H. WATANABE, AND R. OSAWA. 2007. O SIDE CHAIN DEFICIENCY ENHANCES SENSITIVITY OF *ESCHERICHIA COLI* TO SHIGA TOXIN 2-CONVERTING BACTERIOPHAGES. CURR. MICROBIOL. 54:14-19.
65. ILAG, L. L., R. MC KENNA, M. P. YADAV, J. N. BEMILLER, N. L. INCARDONA, AND M. G. ROSSMANN. 1994. CALCIUM ION-INDUCED STRUCTURAL CHANGES IN BACTERIOPHAGE PHIX174. J. MOL. BIOL. 244:291-300.
66. INCARDONA, N. L. 2001. MICROVIRUSES. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES:1-7.
67. INOUE, T., R. SHINGAKI, S. HIROSE, K. WAKI, H. MORI, AND K. FUKUI. 2007. GENOME-WIDE SCREENING OF GENES REQUIRED FOR SWARMING MOTILITY IN *ESCHERICHIA COLI* K-12. J. BACTERIOL. 189:950-957.

68. INSTITUTE, N. A. 2006. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA VIE [EN LIGNE].
[HTTP://NALARC.NASA.GOV/LIBRARY/IMAGES/NEWS_ARTICLES/BIG_274_3.JPG](http://nalarc.nasa.gov/library/images/news_articles/big_274_3.jpg).
69. JANSSON, P.-E., R. WOLLIN, G. W. BRUSE, AND A. A. LINDBERG. 1989. THE CONFORMATION OF CORE OLIGOSACCHARIDES FROM *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA TYPHIMURIUM* LIPOPOLYSACCHARIDES AS PREDICTED BY SEMI-EMPIRICAL CALCULATIONS. J. MOL. RECOGNIT. 2:25-36.
70. JENSEN, E. C., H. S. SCHRADER, B. RIELAND, T. L. THOMPSON, K. W. LEE, K. W. NICKERSON, AND T. A. KOKJOHN. 1998. PREVALENCE OF BROAD-HOST-RANGE LYTIC BACTERIOPHAGES OF *SPHAEROTILUS NATANS*, *ESCHERICHIA COLI*, AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 64:575-580.
71. KAWAURA, T., M. INAGAKI, S. KARITA, M. KATO, S. NISHIKAWA, AND N. KASHIMURA. 2000. RECOGNITION OF RECEPTOR LIPOPOLYSACCHARIDES BY SPIKE G PROTEIN OF BACTERIOPHAGE PHIX174. BIOSCI. BIOTECHNOL. BIOCHEM 64:1993-1997.
72. KAWAURA, T., M. INAGAKI, A. TANAKA, M. KATO, S. NISHIKAWA, AND N. KASHIMURA. 2003. CONTRIBUTIONS OF POLYSACCHARIDE AND LIPID REGIONS OF LIPOPOLYSACCHARIDE TO THE RECOGNITION BY SPIKE G PROTEIN OF BACTERIOPHAGE PHIX174. BIOSCI. BIOTECHNOL. BIOCHEM 67:869-876.
73. KITAGAWA, M., T. ARA, M. ARIFUZZAMAN, T. IOKA-NAKAMICHI, E. INAMOTO, H. TOYONAGA, AND H. MORI. 2005. COMPLETE SET OF ORF CLONES OF *ESCHERICHIA COLI* ASKA LIBRARY : UNIQUE RESOURCES FOR BIOLOGICAL RESEARCH. DNA RES. 12:291-299.

74. KNEIDINGER, B., C. MAROLDA, M. GRANINGER, A. ZAMYATINA, F. MCARTHUR, P. KOSMA, M. A. VALVANO, AND P. MESSNER. 2002. BIOSYNTHESIS PATHWAY OF ADP-L-GLYCERO-B-D-MANNO-HEPTOSE IN *ESCHERICHIA COLI*. J. BACTERIOL. 184:363-369.
75. KODAIRA, K.-I., AND A. TAKETO. 2002. MICROVIRUS - MICROVIRIDAE. THE SPRINGER INDEX OF VIRUSES:535-538.
76. LENSKI, R. E. 1988. EXPERIMENTAL STUDIES OF PLEIOTROPY AND EPISTASIS IN *ESCHERICHIA COLI*. II COMPENSATION FOR MALADAPTIVE EFFECTS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PHAGE T4. EVOLUTION 42:433-440.
77. LENSKI, R. E. 1988. EXPERIMENTAL STUDIES OF PLEIOTROPY AND EPISTASIS IN *ESCHERICHIA COLI* - VARIATION IN COMPETITIVE FITNESS AMONG MUTANTS RESISTANT TO VIRUS T4. EVOLUTION 42:425-432.
78. LENSKI, R. E., AND B. R. LEVIN. 1985. CONSTRAINTS ON THE COEVOLUTION OF BACTERIA AND VIRULENT PHAGE : A MODEL, SOME EXPERIMENTS, AND PREDICTIONS FOR NATURAL COMMUNITIES. AM. NAT. 125:585-602.
79. LINDALEE, T. 2005. LA GUERRE DES PHAGES. PROD. "FILMS A TROIS" DVD.
80. LIU, J., M. DEHBI, G. MOECK, F. ARHIN, P. BAUD, D. BERGERON, M. CALLEJO, V. FERRETTI, N. HA1, T. KWAN, J. MCCARTY, R. SRIKUMAR, D. WILLIAMS, J. J. WU1, P. GROS, J. PELLETIER, AND M. DUBOW. 2004. ANTIMICROBIAL DRUG DISCOVERY THROUGH BACTERIOPHAGE GENOMICS. NAT. BIOTECHNOL. 22:185-191.
81. LOPEZ-PASCUA, L. D. C., AND A. BUCKLING. 2008. INCREASING PRODUCTIVITY ACCELERATES HOST-PARASITE COEVOLUTION. J. EVOL. BIOL. 21:853-860.

82. **LYTHGOE, K. A., AND L. CHAO. 2003. MECHANISMS OF COEXISTENCE OF A BACTERIA AND A BACTERIOPHAGE IN A SPACIALLY HOMOGENEOUS ENVIRONMENT. ECOL. LETT. 6:326-334.**
83. **MEYERS, S. P. 2000. DEVELOPMENTS IN AQUATIC MICROBIOLOGY. INT. MICROBIOL. 3:203-211.**
84. **MICHEL, A., AND O. TENAILLON. 2006. LA COEVOLUTION ANTAGONISTE BACTERIE-BACTERIOPHAGE SUR UN GRADIENT DE RESSOURCES. MASTER RECHERCHE « ECOLOGIE MICROBIENNE » UNIVERSITE LYON 1.**
85. **MIZOGUCHI, K., M. MORITA, C. R. FISCHER, M. YOICHI, Y. TANJI, AND H. UNNO. 2003. COEVOLUTION OF BACTERIOPHAGE PP01 AND *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN CONTINUOUS CULTURE. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 69:170-176.**
86. **MORGAN, A. D., S. GANDON, AND A. BUCKLING. 2005. THE EFFECT OF MIGRATION ON LOCAL ADAPTATION IN A COEVOLVING HOST-PARASITE SYSTEM. NATURE LETT. 437:253-256.**
87. **MULVEY, M. A. 2002. ADHESION AND ENTRY OF UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. CELL. MICROBIOL. 4:257-271.**
88. **MUNIESA, M., L. MOCÉ-LLIVINA, H. KATAYAMA, AND J. JOFRE. 2003. BACTERIAL HOST STRAINS THAT SUPPORT REPLICATION OF SOMATIC COLIPHAGES. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK 83:305-315.**
89. **OCHMAN, H., AND R. SELANDER. 1984. STANDARD REFERENCE STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* FROM NATURAL POPULATIONS. J. BACTERIOL. 157:690-693.**
90. **OHNISHI, M., K. KUROKAWA, AND M. HAYASHI. 2001. DIVERSIFICATION OF *ESCHERICHIA COLI* GENOMES: ARE BACTERIOPHAGES THE MAJOR CONTRIBUTORS? TRENDS MICROBIOL. 9:481-485.**

91. PAL, C., M. D. MACIA, A. OLIVER, I. SCHACHAR, AND A. BUCKLING. 2007. COEVOLUTION WITH VIRUSES DRIVES THE EVOLUTION OF BACTERIAL MUTATION RATES. *NATURE* 450:1079-1081.
92. PANTHEL, K., W. JECHLINGER, A. MATIS, M. ROHDE, M. SZOSTAK, W. LUBITZ, AND R. HAAS. 2003. GENERATION OF *HELICOBACTER PYLORI* GHOSTS BY PHIX PROTEIN E-MEDIATED INACTIVATION AND THEIR EVALUATION AS VACCINE CANDIDATES. *INFECT. IMMUN.* 71:109-116.
93. PEDROS-ALIO, C. 1993. DIVERSITY OF BACTERIOPLANKTON. 8:86-90.
94. PEPIN, K. M., J. DOMSIC, AND R. MCKENNA. 2008. GENOMIC EVOLUTION IN A VIRUS UNDER SPECIFIC SELECTION FOR HOST RECOGNITION. *INFECT. GENET. EVOL.* 8:825-834.
95. PEPIN, K. M., M. A. SAMUEL, AND H. A. WICHMAN. 2006. VARIABLE PLEIOTROPIC EFFECTS FROM MUTATIONS AT THE SAME LOCUS HAMPER PREDICTION OF FITNESS FROM A FITNESS COMPONENT. *GENETICS* 172:2047-2056.
96. PETERSEN, L., J. P. BOLLBACK, M. DIMMIC, M. HUBISZ, AND R. NIELSEN. 2007. GENES UNDER POSITIVE SELECTION IN *ESCHERICHIA COLI*. *GENOME RES.* 17:1336-1343.
97. POON, A., AND L. CHAO. 2005. THE RATE OF COMPENSATORY MUTATION IN THE DNA BACTÉRIOPHAGE PHIX174. *GENETICS* 170:989-999.
98. REEVES, C. E. D., AND C. E. R. DODD. 2006. PHAGE FOR RAPID DETECTION AND CONTROL OF BACTERIAL PATHOGENS IN FOOD. *ADV. APPL. MICROBIOL.* 59:159-185
99. ROHWER, F., AND R. EDWARDS. 2002. THE PHAGE PROTEOMIC TREE : A GENOME BASED TAXONOMY FOR PHAGE. *J. BACTERIOL.* 184:4529-4535.

100. ROKYTA, D. R., C. L. BURCH, S. B. CAUDLE, AND H. A. WICHMAN. 2006. HORIZONTAL GENE TRANSFER AND THE EVOLUTION OF MICROVIRID COLIPHAGE GENOMES. *J. BACTERIOL.* 188:1134-1142.
101. RUSSEL, P. W., AND U. R. MÜLLER. 1984. CONSTRUCTION OF BACTERIOPHAGE PHIX174 MUTANTS WITH MAXIMUM GENOME SIZE. *J. VIROL.* 52:822-827.
102. SASAKI, A. 2000. HOST-PARASITE COEVOLUTION IN A MULTILOCUS GENE-FOR-GENE SYSTEM. *PROC. R. SOC. LOND. B* 267:2183-2188.
103. SCHNAITMAN, C. A., AND J. D. KLENAT. 1993. GENETICS OF LIPOPOLYSACCHARIDE BIOSYNTHESIS IN ENTERIC BACTERIA. *MICROBIOL. REV.* 57:655-682.
104. SGRO, J.-Y. 1994. BACTERIOPHAGE PHIX174 [EN LIGNE]. [HTTPS://S10.LITE.MSU.EDU/RES/MSU/BOTONL/B_ONLINE/LIBRARY/MULTIMEDIA-VIROLOGY/PHIX.JPG](https://s10.lite.msu.edu/res/msu/botonl/b_online/library/multimedia-virology/phix.jpg).
105. SHERBURNE, C., AND D. E. TAYLOR. 1997. EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDE MUTATIONS ON RECIPIENT ABILITY OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM* FOR INCOMPATIBILITY GROUP H PLASMIDS. *J. BACTERIOL.* 179:952-955.
106. SILANDER, O. K., O. TENAILLON, AND L. CHAO. 2007. UNDERSTANDING THE EVOLUTIONARY FATE OF FINITE POPULATIONS: THE DYNAMICS OF MUTATIONAL EFFECTS. *PLOS BIOL.* 5:E94.
107. SKURRAY, R. A., R. E. W. HANCOCK, AND P. REEVES. 1974. CON-MUTANTS: CLASS OF MUTANTS IN *ESCHERICHIA COLI* K-12 LACKING A MAJOR CELL WALL PROTEINE AND DEFECTIVE IN CONJUGAISON AND ADSORPTION OF A BACTERIOPHAGE. *J. BACTERIOL.* 119:726-735.

108. SMITH, H. O., C. A. HUTCHISON III, C. PFANNKUCH, AND J. C. VENTER. 2003. GENERATING A SYNTHETIC GENOME BY WHOLE GENOME ASSEMBLY : PHIX174 BACTERIOPHAGE FROM SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES. PNAS 100:15440-15445.
109. SPANAKIS, E., AND M. T. HORNE. 1987. CO-ADAPTATION OF *ESCHERICHIA COLI* AND COLIPHAGE AVIR IN CONTINUOUS CULTURE. J. GEN. MICROBIOL. 133:353-360.
110. SUMMERS, W. C. 1999. FÉLIX D'HÉRELLE AND THE ORIGINS OF MOLECULAR BIOLOGY. ED. YALE UNIVERSITY PRESS, NEW HAVEN AND LONDON.
111. SUZUKI, M., Y. KANEKO-TANAKA, AND M. AZEGAMI. 1974. TRANSFECTION OF NON-HOST BACTERIAL SPHEROPLASTS WITH BACTERIOPHAGE PHIX174 DNA. NATURE 252:319-321.
112. SZALO, I. M., B. TAMINIAU, AND J. MAINIL. 2006. LE LIPOPOLYSACCHARIDE D'*ESCHERICHIA COLI* : STRUCTURE, BIOSYNTÈSE ET RÔLES. ANN. MED. VET. 150:108-124.
113. THINGSTAD, T. F., AND R. LIGNELL. 1997. THEORETICAL MODELS FOR THE CONTROL OF BACTERIA GROWTH RATE, ABUNDANCE, DIVERSITY AND CARBON DEMAND. AQUAT. MICROB. ECOL. 13:19-27.
114. TOMOYA, B., T. ARA, M. HASEGAWA, Y. TAKAI, Y. OKUMURA, M. BABA, K. A. DATSENKO, M. TOMITA, B. L. WANNER, AND H. MORI. 2006. CONSTRUCTION OF *ESCHERICHIA COLI* K-12 IN-FRAME, SINGLE-GENE KNOCKOUT MUTANTS: THE KEIO COLLECTION. MOL. SYST. BIOL. 2:DOI: 10.1038/MSB4100050.
115. TOUCHON M, HOEDE C, TENAILLON O, BARBE V, BAERISWYL S, BIDET P, BINGEN E, BONACORSI S, BOUCHIER C, BOUVET O, CALTEAU A, CHIAPELLO H, CLERMONT O, CRUVEILLER S, DANCHIN A, DIARD M, DOSSAT C, KAROUI ME, FRAPY E, GARRY L, GHIGO JM, GILLES AM, JOHNSON J, LE BOUGUÉNEC C, LESCAT M, MANGENOT S,

- MARTINEZ-JÉHANNE V, MATIC I, NASSIF X, OZTAS S, PETIT MA, PICHON C, ROUY Z, RUF CS, SCHNEIDER D, TOURET J, VACHERIE B, VALLENET D, MÉDIGUE C, ROCHA EP, AND D. E. 2009. ORGANISED GENOME DYNAMICS IN THE *ESCHERICHIA COLI* SPECIES RESULTS IN HIGHLY DIVERSE ADAPTIVE PATHS. *PLOS GENET.* 5:E1000344.
116. TURNER, P. E., C. L. BURCH, K. A. HANLEY, AND L. CHAO. 1999. HYBRID FREQUENCIES CONFIRM LIMIT TO COINFECTION IN THE RNA BACTERIOPHAGE PHI6. *J. VIROL.* 73:2420-2424.
 117. TURNER, P. E., AND L. CHAO. 1999. PRISONER'S DILEMMA IN AN RNA VIRUS. *LETT. NATURE* 398:441-443.
 118. UZEST, M., S. D. EHRLICH, AND B. MICHEL. 1995. LETHALITY OF *REP RECB* AND *REP RECC* DOUBLE MUTANTS OF *ESCHERICHIA COLI*. *MOL. MICROBIOL.* 17:1177-1188.
 119. VALVANO, M. A., P. MESSNER, AND P. KOSMA. 2002. NOVEL PATHWAYS FOR BIOSYNTHESIS OF NUCLEOTIDE-ACTIVATED GLYCEROL-MANNO-HEPTOSE PRECURSORS OF BACTERIAL GLYCOPROTEINS AND CELL SURFACE POLYSACCHARIDES. *MICROBIOLOGY* 148:1979-1989.
 120. VOS, M., P. J. BIRKETT, E. BIRCH, R. I. GRIFFITHS, AND A. BUCKLING. 2009. LOCAL ADAPTATION OF BACTERIOPHAGES TO THEIR BACTERIAL HOSTS IN SOIL. *SCIENCE* 325:833.
 121. WEINBAUER, M. G., AND F. RASSOULZADEGAN. 2004. ARE VIRUSES DRIVING MICROBIAL DIVERSIFICATION AND DIVERSITY? *ENVIRON. MICROBIOL.* 6:1-11.
 122. WENTWORTH, B. B. 1963. BACTERIOPHAGE TYPING OF THE *STAPHYLOCOCCI*. *BACTERIOL. REV.* 27:253-272.

123. WICHMAN, H. A., M. R. BADGETT, L. A. SCOTT, C. M. BOULIANNE, AND J. J. BULL. 1999. DIFFERENT TRAJECTORIES OF PARALLEL EVOLUTION DURING VIRAL ADAPTATION. *SCIENCE* 285:422-424.
124. WICHMAN, H. A., J. MILLSTEIN, AND J. J. BULL. 2005. ADAPTIVE MOLECULAR EVOLUTION FOR 13 000 PHAGE GENERATIONS : A POSSIBLE ARMS RACE. *GENETICS* 170:19-31.
125. WICHMAN, H. A., L. A. SCOTT, C. D. YARBER, AND J. J. BULL. 2000. EXPERIMENTAL EVOLUTION RECAPITULATES NATURAL EVOLUTION. *PHIL. TRANS. R. SOC. LOND. B* 355:1677-1684.
126. WITTE, A., G. WANNER, U. BLASI, G. HALFMANN, M. SZOSTAK, AND W. LUBITZ. 1990. ENDOGENOUS TRANSMEMBRANE TUNNEL FORMATION MEDIATED BY PHIX174 LYSIS PROTEIN E. *J. BACT.* 172:4109-4114.
127. WITZENRATH, M., B. SCHMECK, J. M. DOEHN, T. TSCHERNIG, J. ZAHLTEN, J. M. LOEFFLER, M. ZEMLIN, H. MÜLLER, B. GUTBIER, H. SCHÜTTE, S. HIPPENSTIEL, V. A. FISCHETTI, N. SUTTORP, AND S. ROSSEAU. 2009. SYSTEMATIC USE OF THE ENDOLYSIN CP-1 RESCUES MICE WITH FATAL PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA. *CRIT. CARE. MED.* 37:642-649.
128. WOESE, C. R., O. KANDLER, AND M. L. WHEELIS. 1990. TOWARDS A NATURAL SYSTEM OF ORGANISMS: PROPOSAL FOR THE DOMAINS ARCHAEA, BACTERIA, AND EUCARYA. *PNAS* 87:4576-4579.
129. YOONG, P., R. SCHUCH, D. NELSON, AND V. A. FISCHETTI. 2009. US PATENT 7582291 - BACTERIOPHAGE LYSINS FOR AND OTHER BACTERIA. [HTTP://WWW.PATENTSTORM.US/PATENTS/7582291.HTML](http://www.patentstorm.us/patents/7582291.html).